

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)



**CONSUMO DE CÁRNICOS REESTRUCTURADOS
CONTENIENDO NUECES EN VOLUNTARIOS
CON RIESGO CARDIOVASCULAR
INCREMENTADO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Amaia Canales Leza

Bajo la dirección de los doctores

Francisco José Sánchez Muniz

Juana Benedí González

Sara Bastida Codina

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-2673-9

© Amaia Canales Leza, 2010



**Consumo de cárnicos reestructurados conteniendo nueces en
voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.**

Doctoranda: **Amaia Canales Leza.**

Universidad: Universidad Complutense.

Facultad de Farmacia, Madrid.

Directores:

Profesor Dr. Francisco José Sánchez Muniz

Profesora Juana Benedí González

Profesora Sara Bastida Codina

Los directores de la Tesis Doctoral titulada “Consumo de cárnicos reestructurados conteniendo nueces en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado” Francisco José Sánchez Muniz, Juana Benedí González y Sara Bastida Codina

CERTIFICAN

Que la parte experimental de la tesis Doctoral se ha realizado en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid en los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología, bajo la subvención de los Proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia, AGL 2001-2398-C03; AGL 2005-07204-C02-01 y AGL 2008-04892-C03-02 y Consolider-Ingenio 2010, referencia CSD2007-00016

Que los ensayos que se recogen en esta tesis doctoral se han realizado siguiendo los procedimientos estándar del Comité de Ética del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid y los de la Declaración de Helsinki como está indicado en la memoria del Proyecto AGL 2001-2398-C03. Todos los voluntarios participantes fueron informados de forma clara y concisa de los objetivos y aspectos concretos del estudio y firmaron un consentimiento informado con anterioridad al inicio del estudio.

Que dicha tesis está inscrita con fecha enero de 2007 y que el 22 de junio de 2010 obtuvo el visto bueno del Consejo de Departamento de Nutrición de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense para su presentación, lectura y defensa.

Lo que certifican en Madrid a veintiséis de julio de dos mil diez

Francisco José Sánchez Muniz Juana Benedí González Sara Bastida Codina

Baltasar Ruiz-Roso y Calvo de Mora, Profesor Titular y Director del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTTIFICA

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada **“Consumo de cárnicos reestructurados conteniendo nueces en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado”** presentada por Dña. Amaia Canales Leza reúne todos los requisitos para ser leída y defendida en tiempo y forma.

Lo que certifico en Madrid a veintisiete de julio de dos mil diez

VºBº del Director de Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que me han ayudado en una u otra forma para poder realizar esta Tesis Doctoral. Pero “dar las gracias”, si bien es una forma de expresar gratitud, a veces se puede quedar corta, porque estamos tan acostumbrados a oír las palabras, que la mayoría de las veces no les otorgamos el valor que tienen, empleándolas como mera fórmula de cortesía. En estas líneas deseo que la palabra “gracias” se interprete en su pleno y total significado como reconocimiento por la confianza, la comprensión, la ayuda, los ánimos y todo lo que hace falta para poder llevar a cabo una labor como ésta.

Todos los que conocemos este mundo sabemos que para elaborar una Tesis Doctoral, no es suficiente estudiar y meter horas, sino que es imprescindible poder contar con la ayuda de las personas, que como en mi caso han sido muchas y variadas.

Mi primer agradecimiento, como no puede ser menos, ya que sin ellos hubiera sido totalmente imposible escribir esta Tesis Doctoral es para mis directores los Doctores D. Sara Bastida Codina, D. Juana Benedi González y D. Francisco José Sánchez-Muniz. Pero al agradecerles la dirección de esta Tesis Doctoral pretendo ir más allá del mundo académico, me gustaría que supieran que soy plenamente consciente de lo mucho que les debo y que lean todas estas palabras como dichas desde el corazón.

De Sara he aprendido que hay que armarse de paciencia y pelear mucho para hacer realidad los sueños. Juana, tú me has enseñado que no basta con trabajar, que hay que implicarse, ser muy metódica y muy ordenada, para que el trabajo dé el fruto perseguido y Paco, el compartir conmigo esa mente tan brillante que tienes, llena de inquietudes intelectuales, que nos ha permitido conocer mejor al ser humano ha sido un privilegio, gracias por no haberme dejado abandonar en los tiempos difíciles, por tantas horas en frente del ordenador, devanándonos los sesos, por ser mi tutor y amigo, de corazón, gracias. Todos estos años en vuestro equipo me han hecho madurar no sólo intelectualmente, sino también como persona, por todo eso y mucho más me siento afortunada.

Me gustaría dar las gracias:

A los Departamentos de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) y de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en los que se han realizado la mayoría de mediciones; gracias a la subvención de los Proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia, AGL 2001-2398-C03; AGL 2005- 07204-C02-01 y AGL 2008-04892-C03-02 y el Consolider-Ingenio 2010, referencia CSD2007-00016os proyectos, así como a todos los miembros de dichos Departamentos, incluyendo a mis compañeros de doctorado e investigación, Josana, Meritxel, Wilma, Arantxa, M^a Ángeles,... .

Al Departamento de Química Orgánica, y en particular al profesor D. Jose María Sánchez Montero por codirigir mi trabajo del Diploma de Estudios Avanzados (DEA).

Al Instituto del Frío, especialmente al equipo de Jiménez Colmenero, por la elaboración de los cárnicos; al Hospital Universitario Puerta de Hierro, concretamente al equipo de Olmedilla Alonso por su labor en el proyecto; a los voluntarios sin los que este estudio no habría sido posible; a la Doctora Pilar Oubiña por sus consejos; a la Escuela de Análisis, por la colaboración prestada; al equipo de la Doctora Dolores Corella por su ayuda en los genotipados; al Doctor Vicente la Hera y a su equipo, por su ayuda.

A mi prima la Doctora Yolanda Fernández de Aránguiz de la Universidad del País Vasco, por sus consejos y estímulos.

Y por último, deseo dar las gracias a mi familia y amigos por estar siempre a mi lado animándome y apoyándome. ¡Gracias a vosotros lo he conseguido!

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Las enfermedades cardiovasculares	2
1.1.1	Aterosclerosis	2
1.1.2	Respuesta inflamatoria en la enfermedad cardiovascular	13
1.2	Radicales libres y sistemas antioxidantes	17
1.2.1	Radicales libres	18
1.2.2	Sistemas antioxidantes	21
1.3	PON1	24
1.3.1	PON1 y genética	26
1.4	Papel de la plaqueta en la aterogénesis	27
1.5	Hemostasia	29
1.5.1	Agregación plaquetaria	30
1.5.2	Influencia de la dieta sobre la agregación plaquetaria, y el metabolismo del AA y el equilibrio TXA ₂ /PGI ₂	37
1.5.3	Leucotrienos	40
1.6	Nueces	42
1.6.1	Composición nutricional de los frutos secos	42
1.6.2	Efectos de las nueces sobre el perfil lipoproteico	44
1.7	Carne	45
1.7.1	Composición	45
1.8	Alimentos funcionales	47
1.8.1	Cárnicos funcionales	48
1.8.2	Efectos buscados por el consumo de cárnicos funcionales	49
2	INTERÉS DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
2.1	Interés del estudio	54
2.2	Hipótesis	54
2.3	Objetivos	55
3	SUJETOS Y MÉTODOS	57
3.1	Preparación de los reestructurados cárnicos	58

3.2	Sujetos	58
3.3	Diseño del estudio	59
3.4	Métodos Analíticos	60
3.4.1	Control y estudio dietético	60
3.4.2	Medidas antropométricas y de tensión arterial	61
3.4.3	Recogida de muestras	62
3.4.4	Colesterol sérico y en lipoproteínas	62
3.4.5	Ácido úrico	63
3.4.6	Actividad paraoxonasa (PON1)	63
3.4.7	Genotipado de la paraoxonasa (PON1)	64
3.4.8	Genotipado de la APO AIV	64
3.4.9	Lipoperóxidos (LPO)	65
3.4.10	Agregación plaquetaria	65
3.4.11	Eicosanoides (TXB ₂ , PGI ₂ y LT)	65
3.4.12	Proteínas totales eritrocitarias	66
3.4.13	Actividad catalasa (CAT) en eritrocitos	66
3.4.14	Actividad superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos	67
3.4.15	Estatus antioxidante, concentración de glutatión en eritrocitos (GSH, GSSG y GSH/GSSG)	67
3.4.16	Moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1)	67
3.5	Estudio estadístico	68
4	EXPOSICIÓN DE RESULTADOS/PUBLICACIONES	69
4.1	PUBLICACIÓN nº 1	71
4.2	PUBLICACIÓN nº 2	73
4.3	PUBLICACIÓN nº 3	75
4.4	PUBLICACIÓN nº 4	77
4.5	PUBLICACIÓN nº 5	79
4.6	PUBLICACIÓN nº 6	81
4.7	PUBLICACIÓN nº 7.	83
5	DISCUSIÓN INTEGRADORA	85
5.1	Composición de la nuez. Importancia de su inclusión en los productos cárnicos. Formulación de cárnicos funcionales.	86

5.2	Mecanismos antioxidantes relacionados con la enfermedad cardiovascular. Papel y controversias sobre la enzima paraoxonasa (PON1)	89
5.3	Efecto del consumo de derivados cárnicos enriquecidos con pasta de nuez sobre el estatus antioxidante en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.	92
5.4	Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre el estatus antioxidante en voluntarios con riesgo cardiovascular portadores de diferentes alelos de la PON1. Interacción dieta-genética	97
5.5	Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre la agregación plaquetaria y trombogénesis en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.	100
5.6	Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre la agregación plaquetaria y trombogénesis en voluntarios con riesgo cardiovascular portadores de diferentes alelos de la APO A4. Interacción dieta-genética	103
5.7	Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre la producción leucotrienos y moléculas de adhesión en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.	105
6	RESUMEN Y CONCLUSIONES	109
6.1	Conclusión general e implicaciones	112
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTADO DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ABCA1	Transportador ATP Binding Cassette A1
ADP	Adenosín difosfato
AE	Arilesterasa
Apo	Apolipoproteína(s)
AG	Ácido(s) graso(s)
AGM	Ácido(s) graso(s) monoinsaturado(s)
AGP	Ácido(s) graso(s) poliinsaturado(s)
AGS	Ácido(s) graso(s) saturado(s)
ANOVA	Análisis de la varianza
bFGF	Fibroblasto básico
CAM	Moléculas de adhesión
CAT	Catalasa
CETP	Proteína transferidora de ésteres de colesterol
CLA	Conjugado del ácido linoleico
CML	Célula muscular lisa
COX	Ciclooxigenasa
CV	Cardiovascular(es)
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DHLA	Ácido dihomogamma linolénico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECV	Enfermedad(es) cardiovascular(es)
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EL	Lipasa endotelial
ELAM	Molécula de adhesión endotelio-leucocito
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fosfolípidos

FLasa	Fosfolipasa
GMP	Guanosín monofosfato
GR	Glutation reductasa
GSH	Glutation reducido
GSH-Px	Glutation peroxidasa
GSSG	Glutation oxidado
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HDL _n	HDL nacientes o inmaduras
LH	Lipasa hepática
ICAM	Molécula(s) de adhesión intercelular
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IL	Interleucina(s)
LCAT	Enzima lecitín-colesterol-acil-transferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LFA	Antígeno asociado a función de leucocitos
LDL-ox	LDL-oxidadas
LM	Cárnico control o cárnico bajo en grasa
LO	Lipoxigenasa
Lp (a)	Lipoproteína (a)
LPL	Lipoproteín-lipasa
LPO	Lipoperóxidos
LT	Leucotrieno(s)
MCP-1	Proteína 1 quimiotáctica para monocitos
mmLDL-ox	LDL mínimamente oxidadas
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PG	Prostaglandina(s)
PECAM	Molécula de adhesión de plaquetas y

	células endoteliales
PLTP	Proteína transferidora de fosfolípidos
PON1	Paraoxonasa 1
PRP	Plasma rico en plaquetas
QM	Quilomicrones
QMr	QM remanentes
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RL	Radical(es) libre(s)
SOD	Superóxido dismutasa
SR-B1	Receptor “scavenger” tipo B1
TBARs	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicérido(s)
TGRL	Lipoproteínas ricas en triglicéridos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TX	Tromboxano(s)
VCAM	Molécula(s) de adhesión vascular
VLA	Antígeno de activación muy tardía
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WM	Cárnico enriquecido en pasta de nuez

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades del corazón y del sistema circulatorio ocasionan 1,9 millones de muertes al año en la Unión Europea¹, representando aproximadamente la mitad de todas las defunciones que se producen anualmente en los países europeos. Dentro de este grupo de enfermedades, la cardiopatía isquémica es una causa fundamental de defunción, produciendo muchas muertes prematuras. Por otro lado, y dado que la asistencia sanitaria de las enfermedades cardiovasculares (ECV) es cara y prolongada, constituyen una gran carga económica con un coste de 192.000 millones de euros al año en Europa².

En España, durante el año 2008, las principales causas de defunciones se debieron a tres enfermedades crónicas: ECV, tumores y enfermedades del sistema respiratorio³. Las ECV se mantuvieron como primera causa de muerte, representando el 31,7% del total de defunciones³. Entre los hombres, las defunciones por enfermedad isquémica del corazón representaron la primera causa de muerte, mientras que en mujeres la primera causa de muerte se debió a accidentes cerebrovasculares³. Estos datos reflejan la importancia que suponen dichas enfermedades como problema de salud en nuestro país, al igual que en la mayoría de los países desarrollados.

Dentro del grupo de las ECV, y a pesar de que España, después de Francia, es el segundo país de la UE, con una menor mortalidad por enfermedad isquémica del corazón, la cardiopatía isquémica origina la tercera parte de las defunciones, lo que supone una tasa de mortalidad de 84,2 por cada 100.000 habitantes⁴.

1.1.1 Aterosclerosis

El primer médico que estudió el movimiento de la sangre en el corazón fue Galeno (131-201aC)⁵. Sin embargo, no sería hasta el siglo XV dC que Leonardo da Vinci descubriera la aterosclerosis al constatar que el proceso de la circulación de la sangre en las personas de edad, se veía dificultado por un engrosamiento de la túnica⁶. En 1799, Caleb Hillier Parry experimentando con ovejas, descubrió una sustancia arenosa dentro de las arterias coronarias, que parecía ser la responsable del proceso anginoso⁵. Así, cien

años más tarde la teoría de la ruptura de la placa de ateroma cobraba interés. A finales del siglo XVIII, dos teorías trataban de explicar la fisiopatología de la aterosclerosis: a) la teoría trombogénica de Carl von Rokitansky, por la que fibrina y otras sustancias de la sangre se acumulaban en la íntima y que degeneraban en una masa con restos de colesterol y otros elementos y b) la teoría inflamatoria de Rudolf Virchow, que proponía un estímulo mecánico como factor desencadenante del proceso inflamatorio de la pared vascular, que concluía en la formación de la placa de ateroma⁵. Russell Ross (1929-1999), basándose en la hipótesis de Virchow postuló que las lesiones ateroscleróticas se debían a una lesión local del endotelio arterial que implicaba la adhesión, agregación y liberación de plaquetas⁵.

El término arteriosclerosis describe el engrosamiento y rigidez de las arterias. Existe una arteriosclerosis fisiológica que obedece a cambios constitucionales debidos fundamentalmente al envejecimiento arterial, entre los que destacan el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y la disminución de la elastina en la pared arterial. Sin embargo, otro término similar “aterosclerosis” también se aplica a diversos tipos de procesos que producen una lesión proliferativa de las capas íntima y media arterial, tras la formación de acúmulos fibroadiposos, que terminan por invadir la luz de las arterias y junto con procesos trombóticos, comprometen la funcionalidad circulatoria de los vasos, originando un proceso de índole isquémica.

La aterosclerosis es un subtipo de arteriosclerosis, considerada como una enfermedad inflamatoria con participación del sistema inmune, proliferación de células del músculo liso y formación de tejido fibrótico. La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que comienza a desarrollarse en la infancia y tarda muchos años en manifestarse. Los ateromas suelen localizarse en la aorta, las arterias coronarias, las arterias cerebrales y las arterias de las extremidades, siendo sus principales formas de expresión clínica la cardiopatía coronaria, la patología vásculo-cerebral y la arteriopatía periférica, respectivamente.

Aunque la etiología de la aterosclerosis no está aun bien definida, existen varias hipótesis que explican su inicio. Así, Goldstein y col.⁷ desarrollaron la teoría lipídica de la aterosclerosis, según la cual, la presencia de niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), quilomicrones remanentes (QMr) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) incrementan su captación por las células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos debido a un incremento en la expresión de los receptores

específicos de dichas lipoproteínas. Particularmente, estos autores señalan que los niveles LDL regulan la expresión de los receptores que hacen que dichas lipoproteínas se introduzcan en las células y liberen su colesterol acumulándose en el interior de las mismas. Dicho acúmulo de colesterol en las células produce, por algún mecanismo no bien conocido, el desarrollo de la aterosclerosis.

Posteriormente Ross⁸ desarrolló la teoría del daño tisular, en la que propuso que son los cambios que tienen lugar en el endotelio vascular los que inician el desarrollo de la aterosclerosis. El endotelio vascular es agredido por toxinas, virus, bacterias, alteraciones inmunológicas, factores mecánicos, etc. produciéndose una disfunción endotelial que se traduce en un incremento de la permeabilidad a las lipoproteínas y a otros constituyentes del plasma, en la activación de la adhesión molecular de los leucocitos y en la migración de los mismos a través del endotelio vascular y en el incremento de la actividad plaquetaria.

En 1989 se desarrolló la hipótesis unificadora de la teoría lipídica de la aterosclerosis y la respuesta al daño endotelial con los conocimientos sobre el papel de las LDL oxidadas (LDL-ox) tanto en el inicio como en la progresión del proceso aterosclerótico (comprobado en numerosos estudios *in vitro* así como en experimentación con animales)⁹. Las investigaciones realizadas en este sentido, indican la importancia de determinados factores en el desarrollo de las placas de ateroma, como son la permeabilidad de la pared arterial, el incremento de las lipoproteínas en el plasma, el menor tamaño de dichas partículas y la presión sanguínea elevada. Además, algunas moléculas liberadas por el endotelio actúan como intermediarios y activadores de los procesos de penetración de las LDL. Así, se han relacionado con el desarrollo de la aterosclerosis los niveles reducidos de óxido nítrico (NO), una molécula clave liberada por el endotelio y que está implicada en procesos de vasodilatación, la agregación plaquetaria, la proliferación de células musculares lisas y la adhesión de monocitos¹⁰.

Con respecto a la importancia del incremento de las lipoproteínas en plasma en el desarrollo de las placas de ateroma, se acepta universalmente que altos niveles de LDL en plasma constituyen un factor importante de riesgo¹¹. Sin embargo, el mecanismo por el que las LDL penetran en la pared arterial no se conoce todavía, aunque hay algunos factores que inducen la entrada de las LDL en la capa íntima, tales como la predisposición genética, el aumento de su concentración plasmática, el menor tamaño de estas lipoproteínas, el aumento de la permeabilidad en los lugares susceptibles a la

formación de la placa de ateroma, la presión arterial, la disminución del flujo sanguíneo en las zonas dañadas y el daño mecánico o inmunológico. Además, también se han relacionado altos niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) con el riesgo de desarrollar ECV y aterosclerosis. Así se cree que las lipoproteínas ricas en TG participan en el desarrollo de la placa de ateroma¹².

Como posible mecanismo de entrada de estas lipoproteínas en los monocitos y en las células musculares lisas, se ha propuesto su reconocimiento por receptores como el de LDL y VLDL, estando implicada la apolipoproteína (apo) B-100 que se unirá al receptor de LDL cuya expresión está regulada por la concentración del colesterol libre en la célula. A su vez esta unión es promovida por mediadores inflamatorios como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina (IL) 1 que estimulan la transcripción de los receptores de LDL en la superficie celular¹². Por otro lado, se ha visto que niveles patológicos de adrenalina y noradrenalina en la sangre favorecen la entrada de las LDL¹³.

Dentro de la capa íntima, las LDL sufren modificaciones tanto en la fracción proteica (la apo B se fragmenta en péptidos más pequeños susceptibles de reaccionar con moléculas oxidadas)¹⁴, como en la fracción lipídica (produciéndose la peroxidación de los lípidos) convirtiéndose en LDL-ox¹⁵. Esta oxidación es probable que no se produzca en el torrente sanguíneo donde la presencia de antioxidantes es evidente¹⁶, por lo que se cree que la presencia de LDL-ox en el plasma se debe al paso de éstas desde el espacio endotelial¹⁶. No obstante, estudios de nuestro grupo señalan que el consumo de grasas termo-oxidadas produce un incremento de la lipoperoxidación [en forma de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)] tanto en hígado como en todas las lipoproteínas¹⁷, con lo que otros mecanismos diferentes de la oxidación en el espacio subendotelial pueden incrementar el contenido de lipoperóxidos en las LDL.

La oxidación de las LDL consiste en una reacción de lipoperoxidación (**Figura 1**):

- Un radical libre (RL) capta un H^+ de un ácido graso insaturado de las LDL transformando a éste en un ácido graso (AG) con un resto carboxilato.
- Sigue una fase de reacciones de propagación.
- La unión de un O_2 da lugar a la formación de un radical peróxido, que en el caso de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) por reordenamiento de los dobles enlaces produce dienos conjugados.

- Los dienos conjugados se descomponen en gran cantidad de moléculas, entre las que sobresalen algunos aldehídos.

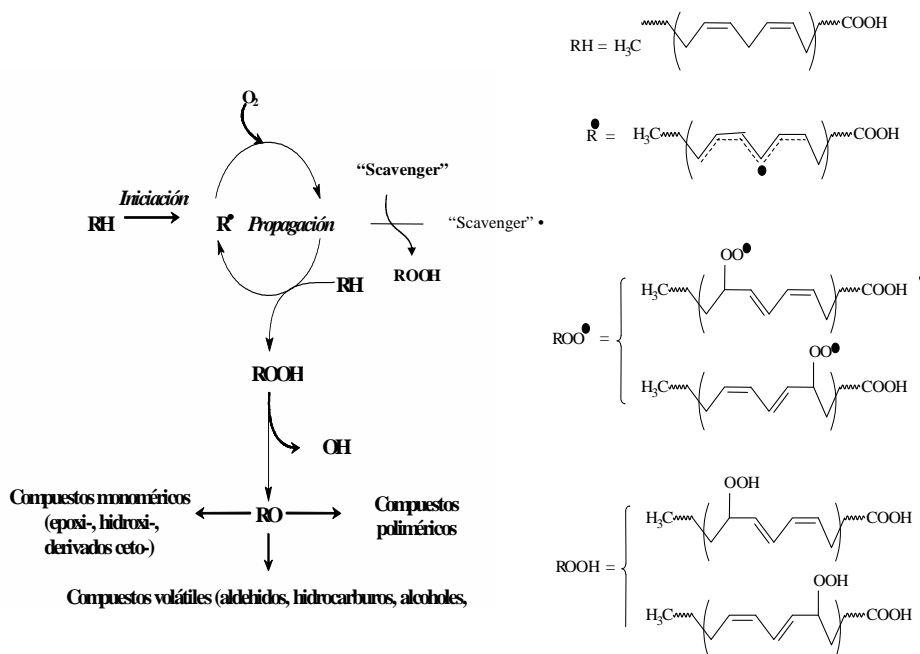


Figura 1.- Oxidación de las LDL. Tomado de Sánchez-Muniz y Sánchez-Montero¹⁹.

"Scavenger" (eliminador o barrendero): se refiere en la figura a molécula "scavenger"; RH : lípido que contiene un ácido graso insaturado; R^\bullet : radical alquilo; OH^\bullet : radical hidroxilo; RO^\bullet : radical alcoxilado; ROO^\bullet : radical peroxialquilo; "scavenger"•: radical "scavenger".

Dicho proceso de oxidación de las LDL sigue un mecanismo caótico y autopropagativo^{18,19} en el que se forman LDL mínimamente oxidadas (mmLDL-ox) y LDL-ox.

Alonso¹⁸ en su trabajo indica que los factores que afectan la susceptibilidad a la oxidación de las LDL son:

- Factores intrínsecos: contenido en AGP y ácidos grasos monoinsaturados (AGM), contenido en antioxidantes endógenos tales como β -carotenos, carotenoides y tocoferoles, la actividad fosfolipasa (FLasa) A_2 intrínseca a las LDL, y el tamaño de la LDL (las más pequeñas y densas se oxidan más fácilmente que las grandes).
- Factores extrínsecos: actividad prooxidante de las distintas células participantes, el contenido plasmático o extracelular de algunos compuestos prooxidantes, la concentración extracelular de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y antioxidantes

como la vitamina C, el tiempo de permanencia de las LDL en la subíntima, y la actividad de enzimas antioxidantes asociadas a las HDL: paraoxonasa (PON1) y arilesterasa (AE).

Además de producirse una acumulación de LDL, también se encuentran en la subíntima VLDL, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), quilomicrones (QM) y lipoproteína (Lp) (a) que pueden peroxidarse y parecen favorecer la llegada y adhesión de los monocitos a las células endoteliales, aspecto que constituye el siguiente paso del proceso aterosclerótico y contribuirá a la formación de las células espumosas que constituyen la estría grasa^{11,20,21}. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el papel de todas estas lipoproteínas en la formación de la placa de ateroma.

En concreto, las LDL-ox son reconocidas por los receptores “scavenger” o captadores o eliminadores promoviendo la adhesión de monocitos y neutrófilos a la pared endotelial a través de moléculas derivadas de los lípidos como son los leucotrienos (LT) y la P-selectina²². Navab y col.²³ han propuesto que uno de los mecanismos de activación se debe a la presencia de ácido araquidónico (AA) oxidado en la fracción fosfolipídica de las LDL. Otros autores también han identificado al 7-cetocolesterol como activador de la proliferación de monocitos²⁴ y a los oxisteroles como estimulantes de la liberación de IL-II-1 β ²⁵. Una vez que los monocitos han penetrado en el interior de la pared arterial, se diferencian en macrófagos que atrapan a las LDL-ox dando lugar a la formación de células espumosas. Estas células producen factores quimiotácticos e inductores que provocan la migración de células musculares desde la capa muscular a la subíntima y crecimiento desordenado de estas células musculares⁸.

Las HDL constituyen las lipoproteínas más pequeñas y más densas. No obstante, cuando se habla de HDL debe tenerse en cuenta que se trata de un grupo muy heterogéneo de partículas, habiéndose definido varias subpoblaciones de diferente composición lipídica y proteica, y por tanto, con densidad, tamaño y carga distintas^{26,27,28}. Estas diferencias estructurales condicionan a su vez que cada subpoblación de HDL tenga funciones fisiológicas diferentes.

Aunque se sintetizan en hígado e intestino delgado^{29,30} de forma preferente, hoy se acepta que todas las células corporales participan en la formación de las partículas HDL mediante el sistema ATP Binding Cassette (ABC)³¹. Las HDL nacientes o inmaduras (HDL_n), pobres en ésteres de colesterol, presentan una estructura discoidal [una pequeña

bicapa fosfolipídica central rodeada abundantemente de apo]. Su apo principal es la apo A-I, aunque las HDL de origen hepático también suelen llevar apo A-II, apo C y apo E.

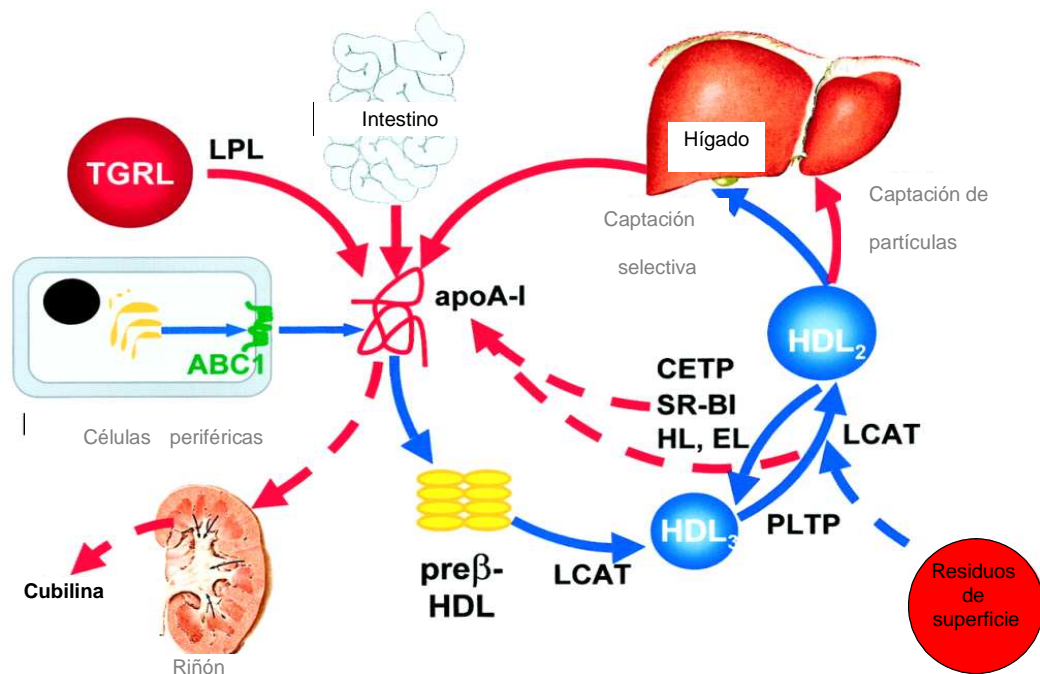


Figura 2.- Esquema de la síntesis y metabolismo de las HDL. Tomado de Nus³².

LPL: lipoprotein lipasa; CETP: proteína transferidora de ésteres de colesterol; LCAT: lecitín colesterol acil transferasa; HL: lipasa hepática; EL: lipasa endotelial; TGRL: lipoproteínas ricas en triglicéridos; SRB1: receptor “scavenger” B1; ABCA1: transportador ATP Binding Cassette A1; PLTP: proteína transferidora de fosfolípidos.

La posterior transformación de estas partículas discoidales en esféricas, denominándose entonces HDL maduras, se realiza cuando estas HDL_n alcanzan los depósitos titulares de colesterol y se produce la captación de colesterol y fosfolípidos (FL) de las VLDL y los QM gracias a la acción de lipoprotein lipasa (LPL), y su conversión en colesterol esterificado por acción de la lecitín colesterol acil transferasa (LCAT)²⁹. Este colesterol esterificado se sitúa en el centro de las HDL, formando las HDL más maduras (**Figura 2**).

Es decir, en este proceso las HDL captarán colesterol de las membranas celulares y del interior de determinadas células, intercambiando lípidos y apo con otras

lipoproteínas. Las HDL irán disminuyendo progresivamente en densidad y tomarán las formas que se han denominado como HDL_n, HDL₃, HDL₂ y HDL₁³³ (**Figuras 3 y 4**). Las HDL₃ y HDL₂ son subpoblaciones de HDL esféricas diferentes que se han descrito como:

- HDL₃: ricas en ésteres de colesterol por acción de la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP). Son las HDL que además de apo A-I tienen una alta concentración de apo A-II. Cuando se lleva a cabo su separación por ultracentrifugación aparecen en la zona de densidades $1,125 < d < 1,21$ g/mL.
- HDL₂: ricas en FL, TG y ésteres de colesterol. Cuando se lleva a cabo su separación por ultracentrifugación aparecen en la zona de densidades $1,063 < d < 1,125$ g/mL.
- Dicha heterogeneidad de las HDL se debe a los procesos extracelulares de remodelado que se esquematizan en las Figuras 2-4 y en los que participan:
- ABCA1³⁴: se localiza en la superficie celular y transfiere colesterol libre desde las células a las apo A-I pobres en lípidos formando las pre β -HDL. Enseguida éstas adquieren FL y más colesterol libre formando las DNL, también conocida como pre β 2-HDL. El sistema ABCA1 ha sido definido recientemente como clave en la formación de HDL_n.
- LCAT: transfiere un grupo acilo desde la fosfatidilcolina al colesterol formando lisofosfatidil colina y ésteres de colesterol. Actúa sobre las HDL_n transformándolas en HDL esféricas y maduras.
- Lipasa hepática (LH): hidroliza los TG y los FL de todas las lipoproteínas, pero en especial de las HDL maduras.
- Proteína transferidora de FL (PLTP): transfiere FL entre lipoproteínas, especialmente importante su función transfiriendo FL desde los QM a las HDL.

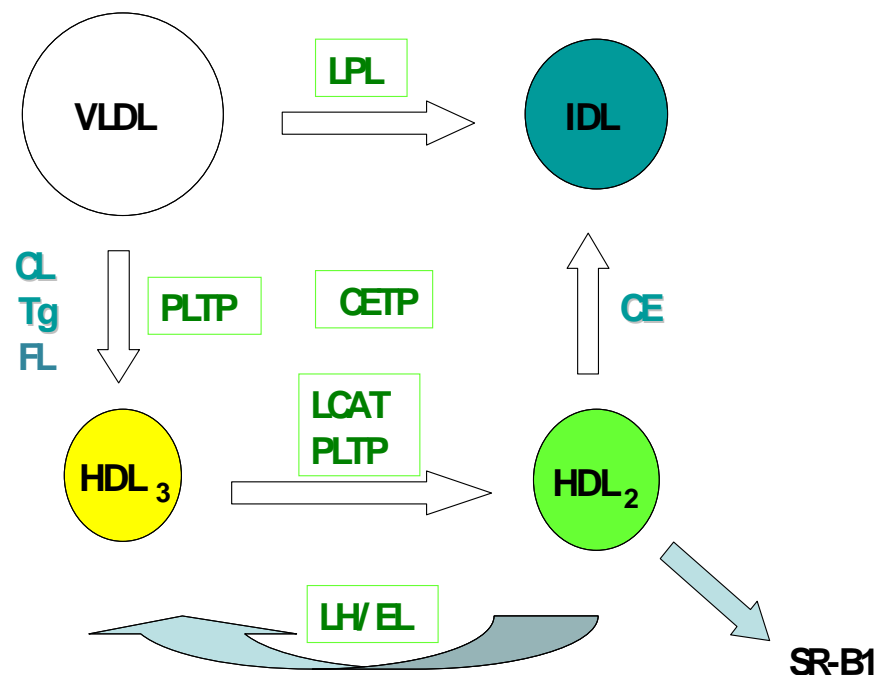


Figura 3.- Interrelaciones entre lipoproteínas. Papel de la HDL en la conversión de VLDL en IDL. Adaptado de Sánchez-Muniz³⁵.

CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol; CE: Colesterol esterificado; CL: Colesterol libre; EL: Lipasa endotelial; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT: Lecitín-colesterol-acil transferasa; LH: Lipasa hepática; LPL: Lipoproteín lipasa; FL: Fosfolípidos; PLTP: Proteína transferidora de fosfolípidos; SR-B1: Receptor “scavenger” tipo B1; Tg: triglicéridos; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

Las HDL intervienen en el transporte reverso del colesterol^{36,37} ya que, transportan el colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado para su excreción o degradación en forma de ácidos biliares, aunque también podría ser utilizado para su incorporación a nuevas lipoproteínas. Además, el aclaramiento de TG del plasma está relacionado con los niveles plasmáticos de HDL³⁸ (**Figura 4**).

Schmitz y col.³⁹ demostraron que las HDL que contienen apo A-I son capaces de unirse a receptores de macrófagos y otros tipos de células. Tras su unión a receptores, las HDL serían internalizadas mediante un sistema que no interacciona con lisosomas, captando colesterol no esterificado del citoplasma celular y siendo resecretadas como una forma de HDL más rica en colesterol. La expresión celular de este tipo de receptores estaría regulada por su contenido en colesterol.

Tabas y Tall⁴⁰ sugieren que la captación de colesterol por las HDL es un proceso en parte relacionado con las características fisicoquímicas de estas partículas y en parte con el receptor de apo A-I, identificado como receptor SR-B1⁴¹.

Este proceso de captación parece quedar restringido a las formas más densas de HDL (HDL_n, HDL₃), mientras que las formas menos densas (HDL₁, HDL₂) interaccionan preferentemente con las otras lipoproteínas⁴². Finalmente las HDL cargadas de colesterol (HDL₂ y HDL₁) serían eliminadas por el hígado en un proceso que es receptor dependiente (Figura 4), no obstante, no está totalmente definido si este proceso de eliminación se realiza por reconocimiento de la apo E o de la apo A-I⁴³.

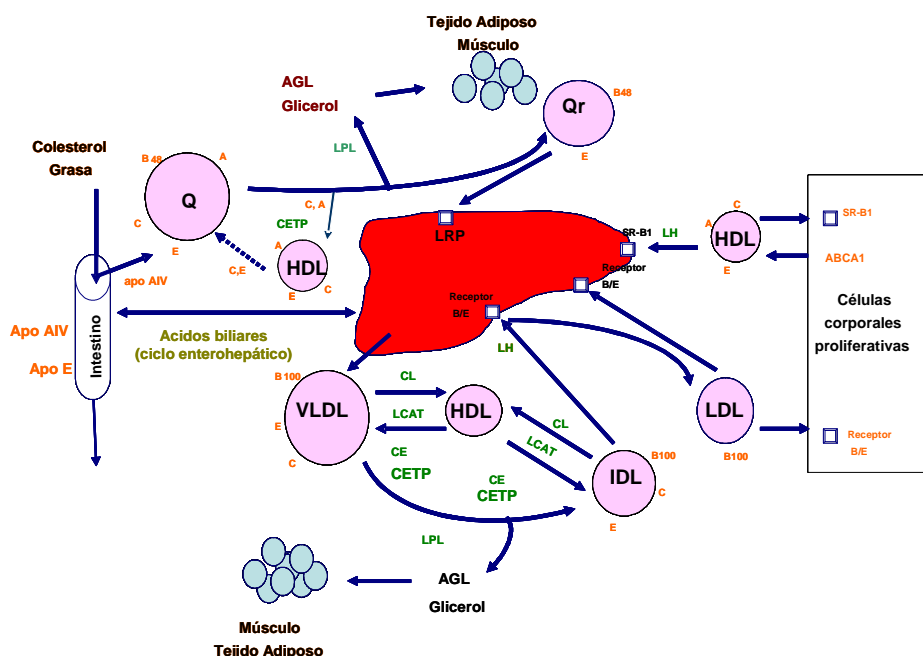


Figura 4.- Esquema general del metabolismo lipoproteico. Adaptado de Sánchez-Muniz³⁵.

ABCA1: Transportador “ATP Binding Cassette” tipo A1; CE: Colesterol esterificado; CETP: Proteína transferidora de ésteres de colesterol; CL: Colesterol libre; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; HL: lipasa hepática; IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT: Lecitín-colesterol-acil transferasa; LDL: Lipoproteína de baja densidad; LPL: Lipoproteín lipasa; LPR: Receptor de lipoproteínas para quilomicrones; QM: Quilomicrones, QMr: Quilomicrón quilomicrón remanente; SRB1: Receptor “scavenger” tipo B1; VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa existente entre concentración de HDL y riesgo cardiovascular (CV)^{44,45,46,47,48}. También se ha comprobado que las HDL inhiben la proliferación de células endoteliales que

favorecen la adhesión de monocitos y fibroblastos en la formación de la placa de ateroma⁴⁹. Por otro lado, otra de las funciones más importantes de las HDL es el transporte reverso del colesterol desde los macrófagos y células tisulares al hígado donde este esteroide puede ser excretado por la bilis directamente o tras su conversión en ácidos biliares⁵⁰, o ser reutilizado en la formación de lipoproteínas (Figuras 2 y 4). Este ciclo comienza con la transferencia de FL desde las células por el transportador ABCA1 a las apo A-I pobres en lípidos formando las pre β -HDL, que por un mecanismo aún desconocido comienzan a cargarse también de colesterol libre⁵¹. Estas pre β -HDL por acción de la LCAT (que esterifica el colesterol libre) se convierten en β -HDL esféricas y pequeñas, las cuales se convierten en β -HDL grandes y esféricas por la acción de la LCAT y la PLTP sobre ellas. Las HDL son transportadas al hígado por dos rutas:

- Directamente por unión al receptor “scavenger” SR-B1.
- Indirectamente, por acción conjunta de la CETP y las HDL, ya que los ésteres de colesterol y FL son transferidos a las LDL y VLDL, las cuales transfieren TG a las HDL formando HDL pobres en ésteres de colesterol y ricas en TG.

Las LDL y las VLDL ingresarán en el hígado a través de los receptores de LDL⁵² y las HDL perderán sus TG convirtiéndose de nuevo en pre β -HDL. El colesterol que transportaban las HDL será excretado en forma de ácidos biliares cerrando el ciclo del transporte reverso del colesterol.

Finalmente, se ha señalado que las HDL tienen actividad antioxidante y son capaces de inhibir la peroxidación lipídica de las LDL^{53,54}. Sin embargo, los mecanismos por los cuales se desarrolla esta actividad inhibitoria aun no están claros. Se han propuesto varias hipótesis^{55,56,57} entre las que destaca aquella que relaciona dichos efectos antioxidantes con las enzimas unidas a las HDL. Los mecanismos de acción, localización y funciones de estas enzimas aún no se conocen con certeza^{58,59,60}.

Una de estas enzimas es la PON1 que inhibe la oxidación de las LDL y facilita el transporte reverso del colesterol y de la que hablaremos más adelante.

La siguiente fase en la formación del ateroma, como consecuencia de la migración y división de células musculares lisas y la formación de fibras de elastina y colágeno, es la formación de la capa fibrosa⁶¹. En esta etapa, disminuye el grosor de la capa media y se aumenta el tamaño y la inestabilidad de la lesión endotelial. Las LDL-ox favorecen la migración de las células musculares a la íntima y el depósito de sustancias insolubles en

el interior de la placa, colágeno y fibroblastos. Este proceso debería ser inhibido por las metaloproteinasas que tienen un efecto proteolítico de la placa; sin embargo, son inhibidas por las LDL-ox⁶². También se conoce que tiene lugar la necrosis tisular como consecuencia de la apoptosis de los macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales por acción de los productos oxidados derivados del colesterol⁶³.

En las lesiones ateromatosas avanzadas se observa una gran fragilidad arterial que suele producir la ruptura de la placa, hemorragias internas y trombosis⁶⁴. Se ha postulado que la calcificación de las placas de ateroma, puede deberse a la diferenciación de los fibroblastos en osteoblastos⁶⁵.

1.1.2 Respuesta inflamatoria en la enfermedad cardiovascular

Como ya se ha comentado, también se puede estudiar la aterosclerosis desde el punto de vista de la inflamación y sus mediadores. La teoría inflamatoria define la aterosclerosis como una alteración inflamatoria compleja que acontece debido a la agresión del endotelio por diversos factores como alteraciones hemodinámicas, hipertensión, RL, lipoproteínas aterogénicas, homocisteína, componentes del tabaco, etc., y cuyo propósito es el de reparar y eliminar el tejido dañado, así como al agente agresor.

Los principales componentes implicados en la respuesta inflamatoria que se da en el endotelio lesionado son:

- Células sanguíneas y elementos formes circulantes: leucocitos, como granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), monocitos y linfocitos, así como las plaquetas.
- Células del tejido conectivo: mastocitos, fibroblastos, macrófagos residentes y linfocitos.
- Moléculas de la matriz extracelular del tejido conectivo: proteínas fibrosas estructurales (colágeno y elastina) y glucoproteínas adherentes (colágeno no fibrilar, fibronectina, etc.)
- Células endoteliales
- Los componentes moleculares de la membrana basal

El fenómeno inflamatorio aterosclerótico acontece debido a daño en el endotelio vascular que atrae a monocitos y linfocitos T al área lesionada para adherirse al

endotelio e invadir la pared arterial. Posteriormente se activa el endotelio, lo que conlleva la expresión/secreción de citoquinas, como la IL-1, los PDGF, el factor fibroblasto básico (bFGF) y los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos [MCP-1]), y se produce la exposición de proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes^{66,67}.

Por su parte, integrinas, selectinas e inmunoglobulinas son moléculas presentes en el leucocito que posibilitan el acercamiento al endotelio y el reconocimiento y fijación al endotelio a través de quimiocinas. Se agrupan principalmente en dos familias: la familia de las selectinas, como la E y la P, denominadas así por su similitud estructural con las lectinas, y las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, como las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y las moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3)⁶⁸. Las CAM actúan como ligandos de las moléculas de adhesión presentes en las membranas de los leucocitos a los receptores del endotelio.

En consecuencia, se liberan diversos factores y citoquinas por los leucocitos que pueden ocasionar la migración de células del músculo liso y proliferación de las mismas en la íntima. Las lesiones fibrosas proliferativas avanzadas de la aterosclerosis pueden presentarse bajo dos formas diferentes; i) como un engrosamiento asimétrico de la capa íntima de la arteria o ii) debido a un rechazo inmune que implica una lesión más bien simétrica. Las reacciones inflamatorias además de atacar al agente agresor pueden tener efecto sobre células sanas, lo que conllevaría el desarrollo de determinadas enfermedades crónicas comunes, como la artritis reumatoide, la fibrosis pulmonar y la aterosclerosis entre otras.

La respuesta inflamatoria puede ser aguda o crónica. En el primer caso, se trata de una respuesta inespecífica cuyos objetivos son: eliminar tejidos muertos, proteger al individuo de una infección local y permitir el acceso a los componentes del sistema inmunológico a la zona afectada. A su vez, los vasos sanguíneos sufren una vasodilatación para aumentar el flujo sanguíneo a la zona, a continuación se produce una salida de proteínas plasmáticas y leucocitos desde el torrente circulatorio al espacio intersticial y una migración de los leucocitos facilitada por factores quimiotácticos para fagocitar, destruir y eliminar al agente agresor. La inflamación crónica implica una

reacción permanente al agente agresor con infiltración de células mononucleares, destrucción tisular, sustitución por tejido conectivo y necrosis tisular.

1.1.2.1 Respuesta vascular

El flujo sanguíneo a la zona lesionada se ve incrementado a través de una vasodilatación modulada por ciertos mediadores como la histamina y el NO. Otros mediadores como bradiquinina, IL-1, TNF α , interferón γ , ciertos eicosanoides (p.e. LT), incrementan la permeabilidad vascular produciendo un aumento de proteínas plasmáticas en el espacio intersticial. Esto conlleva un incremento en la presión intersticial y una reducción de la presión coloidosmótica plasmática y en una última etapa, formación de edema.

Ya que el NO sintetizado por el endotelio tiene como objetivo mantener la homeostasis del endotelio, puede definírsele como una molécula ateroprotectora, vasodilatadora, antiagregante plaquetaria, inhibidora de la proliferación de las células musculares lisas, antioxidante, inhibidora de la expresión de las CAM y de la adhesión de monocitos. Por ello, una alteración en la producción del NO endotelial, alteraría la homeostasis vascular y promovería algunos mecanismos relacionados con la progresión de la lesión aterosclerótica.

1.1.2.2 Respuesta celular

En una primera etapa, denominada migración leucocitaria, los granulocitos, monocitos y linfocitos que circulan libremente en sangre, debido a moléculas quimiotácticas o atrayentes se adhieren al endotelio y penetran al interior de la pared del vaso. Además de las moléculas quimiotácticas se requieren CAM que actúan a modo de receptor de leucocitos. (**Tabla 1**)

Tabla 1.- Clasificación de las moléculas de adhesión (CAM). Tomado de Badimón y Martínez-González⁶⁶.

Familia	Molécula/Nomenclatura (CD)	Célula	Ligando
Selectina	Selectina E (ELAM1, CD62E)	Endotelio	Sialil-Lewis Lewis
	Selectina P (CD62P, PADGEM)	Endotelio, plaquetas	Sialil-Lewis Lewis
	Selectina L (CD62L)	Leucocitos	Sialil-Lewis Lewis
Inmunoglobulinas	ICAM-1 (CD54)	Endotelio, líneas leucocitarias	LFA-1 y Mac-1
	ICAM-2	Endotelio, plaquetas	LFA-1 y Mac-1
	ICAM-3 (CD50)	Leucocitos	
	VCAM-1 (CD106)	Endotelio, CML	VLA-4
	PECAM-1 (CD31)	Endotelio, plaquetas, leucocitos	
Integrinas	VLA-4 (α_4 , β_1)	Leucocitos (monocitos, linfocitos)	
	LFA-1 (CD11a/CD18)	Leucocitos (monocitos, linfocitos)	ICAM-1 e ICAM -2
	Mac-1 (CD11b/CD18)	Leucocitos (monocitos)	ICAM-1 e ICAM-2
	P150, 95 (CD11c/CD18)	Leucocitos (monocitos)	

CML: célula muscular lisa. **ELAM:** molécula de adhesión endotelio-leucocito. **ICAM:** molécula de adhesión intercelular. **VCAM:** molécula de adhesión vascular. **PECAM:** molécula de adhesión de plaquetas y células endoteliales. **LFA:** antígeno asociado a función de leucocitos. **VLA:** antígeno de activación muy tardía

Una vez los leucocitos alcanzan la zona afectada se activan a través de la acción de la FLasa A₂, la producción de enzimas lisosomales y la activación del sistema de defensa oxidativa, la secreción de citoquinas para proceder a la fagocitosis del agente agresor, mediante su reconocimiento y unión, la interiorización del agente agresor y su posterior destrucción. El estallido oxidativo que se produce implica la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), por lo que se necesitan grandes cantidades de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) así como enzimas varias que sean capaces de neutralizar a estas ERO.

1.2 Radicales libres y sistemas antioxidantes

En nuestro organismo se forman continuamente una serie de moléculas o átomos que presentan electrones no apareados en su última capa u orbital electrónico, mostrando en general, una gran agresividad oxidativa celular. Son los llamados RL. Muchos de estos RL incluyen al oxígeno⁶⁹ [radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y radical hidroxilo (OH^{\bullet})] y a su vez existen determinadas moléculas con oxígeno que no presentan electrones desapareados, pero sí muestran reactividad molecular (peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (1O_2) y el ácido hipocloroso (ClOH). Ambos tipos de moléculas o átomos se engloban bajo el nombre de ERO⁷⁰.

Los RL y ERO son responsables del daño oxidativo de macromoléculas biológicas como el ácido desoxirribonucleico (DNA), hidratos de carbono y proteínas⁷¹. Como consecuencia de la formación de RL, en el organismo existen sistemas adecuados no sólo de defensa antioxidante, sino también de reparación del daño oxidativo producido⁷⁰.

El término antioxidante ha sido definido como “cualquier sustancia que, cuando se presenta en bajas concentraciones comparado con las de un sustrato oxidable, significativamente retrasa o inhibe la oxidación de ese sustrato”⁷¹. Las enzimas más importantes directamente involucradas en la detoxificación de las ERO son la superóxido dismutasa (SOD), captadoras de $O_2^{\bullet-}$, así como la catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) las cuales reducen el H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos, respectivamente. Funciones antioxidantes indirectas son mediadas por enzimas que restauran los niveles de antioxidantes endógenos, como ocurre con los niveles de glutatión reducido (GSH)

que son repuestos por la reducción del glutatión oxidado (GSSG) por la enzima glutatión reductasa (GR). El glutatión, el mayor tiol citosólico que sirve como cofactor para varias enzimas detoxificantes (GSH-Px, glutatión-S-transferasa), está involucrado en la reducción de proteínas con disulfuros y adicionalmente es eliminador de ERO, siendo oxidado a GSSG⁷¹.

1.2.1 Radicales libres

En los sistemas biológicos, los RL se están formando continuamente, siendo algunos ejemplos el $O_2^{\bullet-}$ y el HO^{\bullet} , ambos centrados en el oxígeno (las denominadas ERO)⁷⁰. Hay varias fuentes de ERO específicas en el organismo humano. Sin embargo, el $O_2^{\bullet-}$ parece jugar un papel central, a partir del cual se forman otros intermedios reactivos en las reacciones en cadena⁷¹. A pesar de la carencia de reactividad suficiente de este anión radical para atacar directamente a las macromoléculas, en presencia de trazas de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, la combinación del $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 en la reacción de Fenton o Haber-Weiss da lugar a OH^{\bullet} (**Figura 5**). El $O_2^{\bullet-}$ necesita al H_2O_2 para poder producir la especie oxidante (OH^{\bullet}), mientras que el H_2O_2 no necesita al $O_2^{\bullet-}$ para poder hacerlo. Esto, junto con la presencia del H_2O_2 en las células a concentraciones muy superiores a las del $O_2^{\bullet-}$, convierte al H_2O_2 en una especie con gran capacidad de generar daño oxidativo a pesar de no ser un RL. El peróxido de hidrógeno es una especie reactiva no-radical que puede fácilmente difundir entre células vivas y es eficientemente convertida en agua por la enzima CAT, proceso que determina su vida media⁷¹.

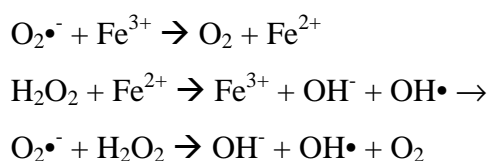


Figura 5.- Reacción de Haber-Weiss, Fenton

La mayor especie reactiva presente en el organismo, es el OH^{\bullet} con una vida media estimada de 10^{-9} s. Hoy en día se considera el principal iniciador del ataque a todo tipo de macromoléculas, aunque se han propuesto otros iniciadores. La alta reactividad del OH^{\bullet} impide su difusión a largas distancias a través de la célula. Puede ser formado *in*

vivo por la irradiación de alta energía (p.e. rayos-X) o a partir de H₂O₂ endógeno en los procesos de catalización por metales (Reacción de Fenton. Figura 5).

Las moléculas diana sobre las que actúan los RL se resumen en la **Tabla 2**. Hay que destacar la vulnerabilidad oxidativa de los AG insaturados, como objetivos diana evidentes de los RL y ERO⁷⁰.

Tabla 2.- Ejemplo de radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Tomado de Mataix y col.⁷⁰.

Radical	Nombre	Moléculas diana
O ₂ • ⁻	Superóxido	Enzimas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
HO•	Hidroxilo	Todas las moléculas
R•	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
RO•	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
ROO•	R-dioxilo (Peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
ROOH	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
¹ O ₂	Óxígeno singlete	Distintas moléculas
NO•	Nitroxilo	Distintas moléculas
CCl ₃ •	Triclorometileno	Oxígeno

La existencia del electrón desapareado, es lo que confiere al RL su altísima reactividad con gran cantidad de moléculas biológicas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), ya que tienden rápidamente a ganar o ceder un electrón para conseguir así una conformación estable. Esta misma rapidez hace que su vida media sea muy corta, lo cual dificulta su estudio⁷².

1.2.1.1 *Mecanismos celulares de producción de radicales libres*

Los RL son producidos generalmente en las células a través de reacciones de transferencias de electrones, con la excepción de algunas circunstancias poco usuales, como la acción de las radiaciones ionizantes. Ésta puede ser mediada con o sin participación enzimática, en este último caso a través de iones metálicos de transición⁷⁰.

Los principales mecanismos de producción de RL son expuestos de forma brillante en el capítulo del Profesor Mataix y col. “Aceite de oliva y estado oxidativo celular”⁷⁰ y son citados a continuación:

- La cadena respiratoria mitocondrial: es con mucho el sistema cuantitativamente más importante de producción de RL⁷⁰.
- Xantina oxidasa⁷³.
- Metabolismo del AA⁷⁴.
- Fagocitos y otras fuentes de radicales: son cuantitativamente, la segunda fuente principal de $O_2^{\bullet-}$ y de otros tipos derivados reactivos del oxígeno.
- Metales en la producción de RL: fundamentalmente son el hierro y el cobre los que participan en la génesis de derivados oxigénicos más agresivos⁷⁵.
- Activación de xenobióticos: durante la activación metabólica de xenobióticos, se produce un “goteo” de electrones desde el citocromo P₄₅₀ en el retículo endoplásmico del hígado formándose $O_2^{\bullet-}$ ⁷⁶.
- Radiaciones ionizantes.

1.2.1.2 Efecto de los radicales libres sobre moléculas y sistemas biológicos

Muchos de los procesos expuestos relacionan a los RL con procesos dañinos para el organismo. Aún así, cuando se controlan sus niveles adecuadamente, los RL también intervienen en procesos útiles para el individuo que incluyen procesos muy variados como la defensa frente a la infección, la destoxificación de xenobióticos, la coagulación sanguínea, la carboxilación del ácido glutámico, la señalización celular por NO, la modulación de segundos mensajeros como el guanosín monofosfato (GMP) cíclico, las acciones de prostaglandinas (PG) y LT, la agregación plaquetaria, etc.

Los RL pueden actuar tanto sobre pequeñas biomoléculas libres (vitaminas, aminoácidos, hidratos de carbono simples, lípidos), como sobre macromoléculas (proteínas o ácidos nucleicos) o estructuras supramoleculares (membranas y lipoproteínas).

Básicamente los objetivos de los RL son:

- *Biomoléculas de bajo peso molecular*: como son vitaminas (ácido ascórbico, carotenoides, α -tocoferol, ubiquinonas), hidratos de carbono (glucosa,

ribosa), aminoácidos (histidina, triptófano, metionina), ácido úrico, colesterol, y pequeños péptidos solubles como el glutatión⁷⁰.

La oxidación del colesterol es de particular interés biológico, puesto que se producen hidroperóxidos de colesterol y una familia de oxisteroles oxidados en el anillo beta del esterol. Estos derivados del colesterol oxidado están implicados en la ECV entre otras patologías⁷⁰.

- *Proteínas:* Dos de las más graves consecuencias biológicas de la acción de RL/ERO son la oxidación de enzimas y de proteínas estructurales, lo que conlleva la pérdida de la funcionalidad en el primer caso y alteraciones importantes en la arquitectura celular en el segundo⁷⁷. Las proteínas pueden ser objeto de ataque por radicales secundarios, como los que derivan de la peroxidación lipídica y/o sus productos⁷⁰.
- *Ácidos nucleicos y activación genética.*
- *AGP:* sustratos de peroxidación lipídica.

1.2.2 Sistemas antioxidantes

En el mundo aeróbico, frente a la considerable toxicidad del oxígeno, los organismos vivos han puesto en marcha mecanismos adaptativos que se organizaron como sistemas de defensa frente al oxígeno⁷⁸.

Aunque una fracción de los RL generados en el organismo es capaz de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes, con lo cual producirán un cierto nivel de daño, la mayor parte de los RL- al menos en muchas partes de la célula- son eliminados mediante antioxidantes. En consecuencia, las células desarrollan una serie de sistemas de defensa frente a su acción perniciosa.

Existen varias clasificaciones de las defensas antioxidantes, entre ellas destacaremos:

1.- Defensas antioxidantes primarias y secundarias

Las primarias previenen el fenómeno oxidativo impidiendo la formación del RL, o eliminando el RL cuando éste se forma. Aquí se incluirían la vitamina E, el ácido ascórbico, β -caroteno, ácido úrico, y algunas enzimas como SOD, GSH-Px y CAT⁷⁰. En cuanto a las secundarias, su función no residiría en ser protectoras o eliminadoras del agente antioxidante, sino que su papel sería el de eliminar los productos nocivos formados, impidiendo una acumulación indeseable. En este segundo grupo se incluyen

enzimas de reparación del DNA, exonucleasas y endonucleasas, enzimas proteolíticos (proteasas y peptidasas), enzimas lipolíticos (FLasa A₂) y transferasas⁷⁰.

2.- Defensas antioxidantes en función del mecanismo de acción

Actualmente se pueden denominar los sistemas antioxidantes en función de los mecanismos de acción: antioxidantes de prevención, antioxidantes captadores de RL (radical “scavenger”) y sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis *de novo*. Dichas defensas se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3.-Clasificación de las defensas antioxidantes según el mecanismo de acción Tomado de Mataix y col.⁷⁰.

Tipo de sistema de defensa	Mecanismo de acción	Nombre del antioxidante
Antioxidantes de prevención	Suprimen la formación de RL	
	- Descomposición no radical de LOOH y H ₂ O ₂	CAT, GSH-Px y S-transferasa
	- Secuestro del metal por quelación	Transferrina, Ceruloplasmina, Haptoglobina
	- Inactivación del O ₂ activo	SOD, Carotenoides
Antioxidantes eliminadores de radicales	Eliminan radicales al inhibir el inicio de la cadena y romper la propagación de la cadena	-Lipofílicos: Ubiquinol, Vitaminas E y A, Carotenoides -Hidrofílicos: Ácido úrico, Ácido ascórbico, Albúmina, Bilirrubina
Enzimas de reparación y “de novo”	Reparan los daños y reconstituyen la membrana	Enzimas de reparación del DNA, Proteasas, Transferasas, Lipasas

CAT: catalasa; GSH-Px: glutathion peroxidada; SOD: superóxido dismutasa; DNA: ácido desoxirribonucleico

3.- Sistemas antioxidantes que pueden clasificarse según su naturaleza en: sistemas antioxidantes enzimáticos y sistemas antioxidantes no enzimáticos. El descubrimiento

en 1968 de la SOD, una enzima que actúa específicamente sobre un RL, despertó el interés de científicos por los sistemas antioxidantes. En condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción de RL y su destrucción por los sistemas antioxidantes, sin embargo, este equilibrio puede alterarse si (tanto de forma natural como artificial) se aumenta la producción de RL, o se encuentran disminuidos los sistemas de defensa⁷⁹.

1.2.2.1 Mecanismos enzimáticos

Sólo existen enzimas detoxificantes para el radical anión superóxido y para el peróxido de hidrógeno. Por tanto, el modo de evitar la formación del radical hidroxilo consistirá en eliminar esas dos especies activas⁸⁰. Dentro de los mecanismos enzimáticos, algunos actúan en el interior de las células, mientras que otros parecen ser más eficaces en el medio extracelular.

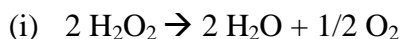
Algunas de estas enzimas son:

1.2.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Las SOD son enzimas que eliminan el radical superóxido. Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta O₂ molecular, mientras que la otra se reduce a H₂O₂. Por tanto, más que eliminar formas activas del oxígeno, esta enzima transforma el anión superóxido en H₂O₂.

1.2.2.1.2 Catalasa (CAT)

Enzima presente en el citosol, mitocondrias y otros orgánulos, y en concentraciones bajas o ausentes en el plasma. Las CAT catalizan dos tipos de reacciones, actuando sobre el H₂O₂ muy eficazmente de dos maneras⁷⁰:



1.2.2.1.3 El glutatión

El glutatión se presenta en dos formas, GSH y GSSG. El cociente GSSG/GSH ha de mantenerse bajo, ya que la medida de la tasa GSSG/GSH es uno de los estimadores más fiables del grado de estrés oxidativo tisular⁷⁰. El GSH es un tripéptido que

principalmente se sintetiza en hígado. Sin embargo también se ha visto que se puede sintetizar en el eritrocito maduro y desprovisto de núcleo⁸¹.

Las GSH-Px son enzimas celulares que catalizan la descomposición de los hidroperóxidos (ROOH), reduciéndolos a formas estables como los hidróxidos (ROH), utilizando específicamente el GSH como reductor dando lugar al GSSG⁷⁰, mediante la siguiente reacción



El GSH es el elemento central de muchos sistemas detoxificadores. Se trata de una molécula que tiene un grupo sulfhidrilo (-SH) que la hace idónea para atenuar el efecto de los RL. Por ello, es empleado como un cofactor esencial en diversos sistemas enzimáticos. Un claro ejemplo lo constituye el sistema de GSH-Px. La enzima contiene selenio, probablemente como parte de un centro activo. Es específica para su donante de hidrógeno, el GSH, no siendo específica para el hidroperóxido. Esta falta de especificidad de sustrato aumenta su capacidad de acción, actuando sobre moléculas: como H₂O₂ o los hidroperóxidos orgánicos. Por lo tanto, aunque la GSH-Px comparte el sustrato H₂O₂ con la CAT, puede reaccionar, del mismo modo, con los hidroperóxidos orgánicos (ROOH)⁷⁰.

1.3 PON1

Aunque en el apartado resultados se presenta una revisión sobre la enzima PON1⁸², se detallan a continuación algunos aspectos relevantes de esta enzima y su implicación en la ECV. Diversos autores han sugerido que el efecto beneficioso de las HDL en la ECV se debe a la enzima PON1 (EC 3.1.8.1. arildialquil fosfatasa) que lleva unida. Se trata de una glicoproteína Ca²⁺-dependiente de 44 kDa que presenta 3 actividades principalmente⁸³ (**Figura 6**):

- Arilesterasa: que hidroliza ésteres aromáticos como el acetato de fenilo.
- Paraoxonasa: que hidroliza compuestos organofosforados (paraoxón, soman, sarin, etc.).
- Lactonasa: que hidroliza lactonas aromáticas y alifáticas (dihidrocumarina, lactona del ácido homogentísico) además de catalizar la reacción reversa de lactonización

de ácidos hidroxicarboxílicos^{84,85}.

Según Mackness⁸⁶ el hígado es el principal responsable de la síntesis, almacenamiento y secreción de la PON1. La primera vez que un investigador, Uriel,⁸⁷ detectó mediante electroforesis del suero humano la actividad de la enzima PON1 en inmunoprecipitados de HDL, fue en 1961. Posteriormente gracias a la técnica de filtración en gel *fast protein liquid column chromatography* (FPLC) se supo que la enzima PON1 está íntimamente asociada a la fracción de HDL en el suero humano. Debido a que al intentar separar la PON1 de la HDL es muy difícil separar la enzima PON1 de la Apo AI, se ha sugerido que la Apo AI es un factor que condiciona dicha ubicación⁸⁸. El proceso de purificación de dicha enzima es complejo y sus coordenadas no se incluyeron en el Protein Data Bank (PDB)⁸⁹ hasta el año 2004. Diversas fuentes bibliográficas proponen que la enzima PON1 obtenida por inmunopurificación se localiza en una subfracción de las HDL donde a su vez se hallan la apo A-I y la apo J o clusterina^{90,91}.

Su presencia se ha detectado en las HDL₃ y en la fracción de las lipoproteínas de muy alta densidad ($d > 1,21$ g/mL)^{90,91}.

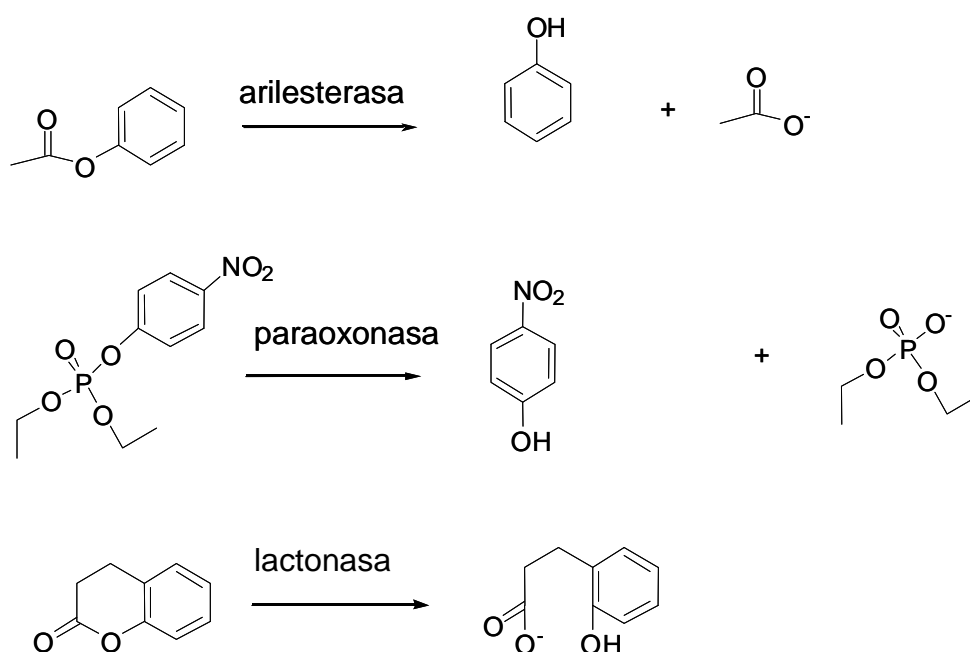


Figura 6.- Esquema de las reacciones catalizadas por la PON1.

También se encuentra en suero y en líquido intersticial⁹², y en órganos como el hígado, el riñón y el intestino delgado, sin embargo se desconoce si la enzima PON1 de estos tejidos contribuye a la actividad plasmática⁹³.

La enzima PON1 ha sido recientemente purificada y cristalizada por Harel y col.^{94,95}.

Aunque aún se siguen desconociendo muchos aspectos de esta enzima, numerosos estudios han llegado a la conclusión de que las propiedades antiaterogénicas de la PON1 se deben a:

- Protección frente al estrés oxidativo de las LDL, HDL y macrófagos^{96,97,98,99,100,101,102,103,104,105}.
- Inhibición de la síntesis de moléculas que facilitan la adhesión de monocitos a la pared de los vasos sanguíneos^{106,107,108}.
- Disminución de la captación de LDL-ox por los macrófagos impidiendo la formación de las células espumosas¹⁰⁹.
- Inhibición de la biosíntesis del colesterol por los macrófagos¹¹⁰.

1.3.1 PON1 y genética

El gen PON1, junto con los genes PON2 y PON3 pertenece a una familia de multigenes con secuencias aminoacídicas similares¹¹¹. El gen PON1 se localiza en los seres humanos en la posición q21.3-q22.1 del brazo largo del cromosoma 7^{112,113}.

La enzima PON1 tiene 354 aminoácidos y un peso molecular de alrededor de 43kD¹¹¹. Muestra polimorfismo genético, de ahí que la actividad frente a los sustratos sea diferente en función de la isoforma que actúe. La isoforma determinada por el aminoácido de la posición 192 puede llevar arginina/glutamina (R/Q) y el polimorfismo del aminoácido 55, donde puede hallarse una leucina o una metionina (L/M). La isoenzima Q (de baja actividad frente al paraoxon) se da cuando la posición 192 está ocupada por la glutamina, y la aloenzima R (de alta actividad frente al paraoxon) cuando el aminoácido es la arginina¹¹⁴.

Existen numerosos estudios epidemiológicos, donde la enzima PON1 ha sido relacionada con algún factor de riesgo que se considera controlable para la prevención de la aterosclerosis. Así, en numerosos trabajos, dicha enzima se ha relacionado con el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria^{83,115} y/o infarto de miocardio^{116,117}.

En ellos, se han observado niveles bajos de actividad paraoxonasa^{115,116}. En el estudio Caerphilly¹¹⁸, se observó que la actividad PON1 era un 20% menor en individuos que sufrieron un evento coronario¹¹⁸. Además, se concluyó que la PON1 era un buen marcador de riesgo de ECV¹¹⁸.

Actualmente se postula que el beneficio CV depende de la isoforma que se presente, así la aloenzima R es más activa frente a sustancias como el paraoxon⁸⁶ y metilparaoxon, sin embargo los individuos que presentan dicha isoforma parecen estar menos protegidos frente a ECV, mientras que la aloenzima Q es más activa frente al diazoxon⁸⁶ y los gases nerviosos: sarin, soman y parece ser un factor protector CV.

A pesar de que existe abundante información bibliográfica sobre la PON1, no existe consenso sobre el papel de esta enzima en situaciones donde la concentración de otros antioxidantes sea elevada¹¹⁹. Tampoco se conoce la forma por la que el sistema PON1 afecta a otros sistemas antioxidantes.

Por otro lado, la PON1 es capaz de hidrolizar el fenilacetato. Estudios llevados a cabo por nuestro grupo han puesto de manifiesto un nuevo mecanismo de acción de la PON1, la acción AE, y ha desarrollado un método para su cuantificación¹²⁰. No obstante, se desconoce si los polimorfismos del gen de la PON1 condicionan el estatus antioxidante global del individuo de forma relevante o si sólo incide en la reducción de peroxidación en las LDL y HDL.

1.4 Papel de la plaqueta en la aterogénesis

La plaqueta desarrolla un papel fundamental en el proceso inflamatorio y en la ECV. Se forma a partir de los megacariocitos, células hematopoyéticas de mayor tamaño que surgen de la Unidad Formadora de Colonias Megacariocíticas, que deriva a su vez del megacarioblasto y éste a su vez de la célula madre hematopoyética multipotencial. Las plaquetas carecen de DNA, pero están dotadas de ácido ribonucleico (RNA) mensajero y de elementos de transcripción, lo que les permite sintetizar proteínas¹²¹. Constituyen los elementos formes más pequeños de la sangre, con un diámetro de 1 a 4 μm y de forma discoidal o lenticular. Tienen una vida media de ocho a once días. En condiciones fisiológicas del orden de 1.5×10^{12} plaquetas se encuentran circulando por la sangre, que no interaccionan la pared de los vasos sanguíneos, debido a la carga negativa de las glicoproteínas de la pared y de las plaquetas¹²². Participan en la formación del tapón

hemostático primario, que impide la extravasación de sangre ante una lesión y mantiene la integridad del endotelio vascular; la activación de las proteínas plasmáticas del sistema de coagulación y la liberación de mediadores para la reparación del vaso lesionado, y también regulan las reacciones inflamatorias¹²³.

En cuanto a su morfología, cabe diferenciar una zona periférica, otra intermedia y una última central. La zona periférica está constituida por una membrana de 70-90 nm de espesor y estructura trilaminar. El revestimiento externo es el glicocáliz, que está formado por glicoproteínas y glucosaminoglicanos. De todas las glicoproteínas de membrana que se han descubierto, las más conocidas son la I, II y III. En concreto, las glicoproteínas IIb y IIIa forman un complejo involucrado en la adhesión al subendotelio tras la lesión, que tras la activación plaquetaria se altera y se une al fibrinógeno y a otras proteínas plasmáticas¹²³. Los FL constituyen la fracción lipídica de la membrana plaquetaria. Destaca una fosfatidilserina, de gran actividad procoagulante y el fosfatidilinositol, que forman parte del factor 3 plaquetario, necesario para la correcta hemostasia.

La zona intermedia está ocupada por el citoesqueleto que está integrado por microtúbulos, que son los responsables de conferir a la plaqueta su forma discoidal cuando circula. Tras la activación, dicho citoesqueleto no es detectable.

En la zona central, repartidos por el citoplasma, se encuentran los microfilamentos que constituyen el sistema contráctil. Están representados por actina, miosina, tropomiosina, α -actinina, filamina y troponina. Existe un sistema canalicular abierto, comunicado con el medio extracelular que se encarga de la función secretora. En particular, cuando la plaqueta se activa, los gránulos plaquetarios liberan así, su contenido al exterior de la célula.

En el interior de la plaqueta encontramos el sistema fosfolipasa-tromboxano sintetasa, encargado de sintetizar endoperóxidos y eicosanoides a partir del AA.

En el citoplasma distinguimos:

- Los *gránulos α* que contienen proteínas no específicas de las plaquetas como son la albúmina, el fibrinógeno, la fibronectina, el factor de von Willebrand, el quinínógeno de alto peso molecular y el factor V. Entre las proteínas específicas distinguimos por un lado, las que se expresan en la superficie plaquetaria sólo tras la activación, como la glicoproteína IIa y la trombospodina, y por otro, las proteínas catiónicas, como el PDGF, que estimula el crecimiento de los

fibroblastos y de células del músculo liso de la pared vascular, el factor plaquetario 4 que neutraliza la acción anticoagulante de la heparina, compitiendo a nivel de receptores con la antitrombina III, y la β -tromboglobulina con actividad antiheparínica muy débil¹²⁴.

- Los *gránulos densos* que contienen adenosin trifosfato (ATP), adenosin difosfato (ADP), pirofosfato, serotonina y cationes divalentes: Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- Los *lisosomas plaquetarios* portadores de enzimas hidrolíticas (hidrolasa ácida, proteasa, catepsina) cuya liberación está relacionada con procesos de lisis celular.
- Los *gránulos de glucógeno* que proporcionan energía a la plaqueta. Sin embargo, la mayor parte de la energía que utiliza la plaqueta proviene del ADP citoplasmático.

1.5 Hemostasia

La hemostasia se define como el conjunto de mecanismos fisiológicos de que dispone el organismo para combatir una hemorragia. Los vasos sanguíneos, las plaquetas, las proteínas de la coagulación y el sistema de fibrinólisis, interaccionan entre sí para que se de la formación y lisis de coágulos, que se cierran las heridas en el tejido conjuntivo y que la sangre fluya con normalidad por los vasos sanguíneos. El organismo se encuentra en equilibrio hemostático cuando existe un equilibrio entre situaciones de hemorragia y trombosis.

Se habla de hemostasia primaria y secundaria, sin embargo esta clasificación es solamente didáctica, ya que ambos procesos se activan de forma simultánea, al igual que ocurre con el fenómeno de la fibrinólisis, que descompone el coágulo y reestablece la fluidez habitual de la sangre dentro de los vasos. Los fenómenos hemorrágicos o trombóticos ocurrirán cuando la hemostasia es excesiva, para el primer caso, o la fibrinólisis es deficiente para el segundo.

Se conocen tres mecanismos principales mediante los cuales el endotelio vascular mantiene inactiva la plaqueta circulante gracias:

- Vía AA (a través de la prostaciclina): las células endoteliales transforman el AA en prostaciclina mediante la ciclooxigenasa (COX) 1 o 2 y la prostaciclina sintetasa.

La prostaciclina inhibe la agregación plaquetaria incrementando el adenosín monofosfato cíclico¹²⁵.

- Vía NO: el NO es sintetizado a partir de la L-arginina. El NO en las plaquetas estimula la síntesis de GMP cíclico, que regula algunas quinasas y mantiene bajos los niveles de calcio intracelular. Esto impide el cambio conformacional de GPIIb/IIIa de las plaquetas y por lo tanto impide su activación^{123,125, 126, 127}.
- Vía ecto adenosin-difosfatasa (ecto ADPasa o CD39)¹²⁸: la ecto-ADPasa mantiene bajas las concentraciones de ADP y ATP, inhibiendo por tanto la activación plaquetaria.
- Vía de la heparin sulfato y la trombomodulina: intermediadores en la activación de la proteína C y la síntesis de trombina, respectivamente.
- Vía activador tisular del plasminógeno: que se sintetiza y libera impidiendo la estabilización del trombo y favoreciendo la degradación del aglomerado de fibrina.

Sin embargo, cuando se produce daño al endotelio, y los mecanismos anteriores no son suficientes, las plaquetas inician la cascada de la coagulación para impedir la hemorragia y mantener controlada la formación de trombos¹²³.

Anteriormente se creía que para que se diera la activación plaquetaria era necesario que el endotelio se quedara al descubierto, sin embargo, hoy en día se ha sugerido que la lesión comienza cuando los mecanismos anteriores de defensa del endotelio fracasan, cuando las ERO están incrementadas^{129,130,131,132} o cuando los mediadores protrombóticos se encuentran en exceso¹³³.

En definitiva, si los mecanismos de defensa del endotelio son insuficientes, se inicia el proceso de agregación plaquetaria, cuyo objetivo es formar un tapón plaquetario que impida la progresión de la lesión.

1.5.1 Agregación plaquetaria

Dicho proceso se subdivide en tres fases:

- adhesión plaquetaria
- activación plaquetaria y liberación de sustancias
- agregación plaquetaria propiamente dicha

En la agregación plaquetaria actúan principalmente: el endotelio vascular, el factor de von Willebrand, necesario para que se produzca una adhesión estable entre la

plaqueta y el endotelio vascular, y el fibrinógeno, artífice de la formación de puentes entre las plaquetas y por tanto de la agregación plaquetaria.

1.5.1.1 Adhesión plaquetaria

Al lesionarse el endotelio, en la fase inicial de la hemostasia primaria, las plaquetas se adhieren al factor de von Willebrand endotelial y se localizan sobre la matriz de colágeno del endotelio formando una monocapa de plaquetas. Dicho factor se une tanto al colágeno como a los dos receptores principales de las plaquetas el GP Ib/V/IX y el GP IIb/IIIa (α -II β 3 integrina)^{123,126,127}.

Las plaquetas también se unen al endotelio lesionado a través de la P selectina endotelial, molécula que también es posible hallar en los gránulos α de las plaquetas¹³⁴. Cuando las plaquetas se adhieren a la zona vascular dañada, el tapón hemostático se estabiliza mediante la unión de plaquetas circulantes atraídas a la zona de la lesión por factores activadores¹²³ entre los que se encuentran el ADP, el tromboxano (TX) A₂, la serotonina, el colágeno y la trombina¹²⁷, siendo este último el más potente^{135,136}. Estos factores activadores se describen con más detalle en el siguiente apartado.

1.5.1.2 Activación plaquetaria y liberación de sustancias

La plaqueta debe activarse y secretar diversos compuestos contenidos en sus gránulos específicos¹³⁷. Las sustancias fundamentales implicadas en la activación plaquetaria son las siguientes:

- a) ADP: Se ha definido que las plaquetas presentan dos receptores para el ADP (P2Y1 y P2Y12). La unión del ADP al receptor P2Y2 conlleva un cambio de forma en la plaqueta así como una agregación momentánea, mientras que la unión al P2Y12 implica la activación de la cascada de la coagulación y la formación y estabilización del trombo^{138, 139} (**Figura 7**). El receptor P2Y12 es el responsable de la amplificación de la agregación plaquetaria inducida por otros agentes como serotonina, TXA₂ y trombina¹³⁷. El ADP es responsable de la agregación plaquetaria no sólo de forma protectora, es decir, cuando se forma la capa inicial de plaquetas para frenar la lesión, sino también de forma patológica, cuando el trombo ya está formado y se depositan sobre él más plaquetas.

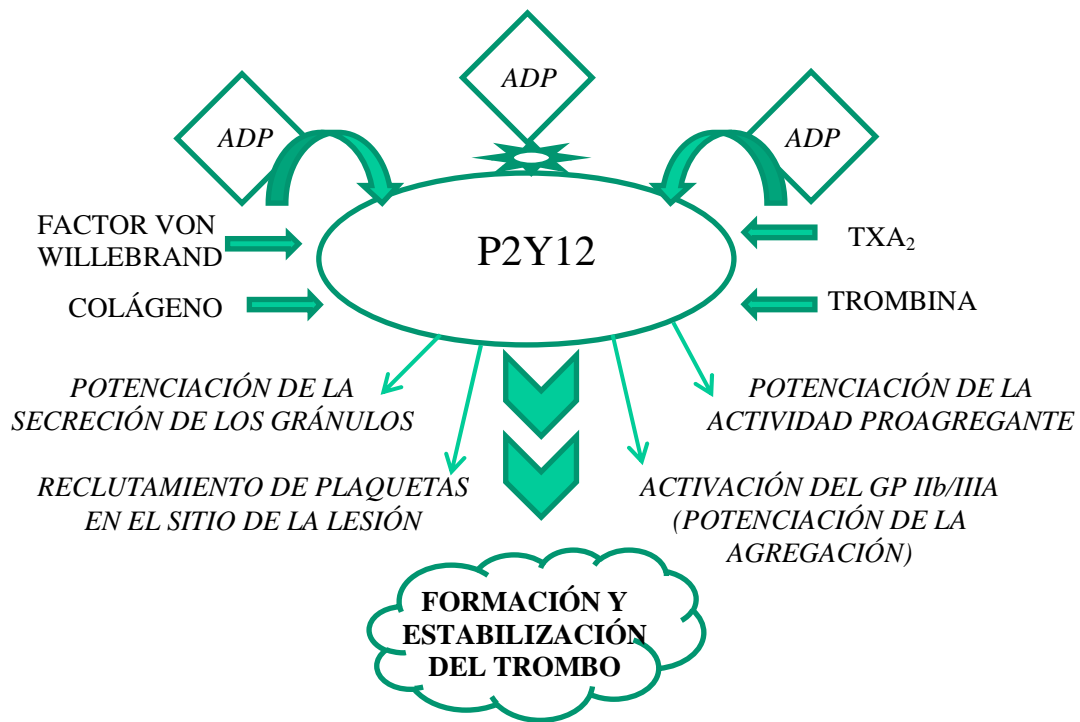


Figura 7.- Papel del receptor P2Y12 en la activación plaquetaria. Adaptado de Derian y col.¹³⁹.

ADP: adenosin difosfato; **P2Y12:** Receptor plaquetario de ADP; **TXA₂:** Tromboxano A₂

- b) TXA₂: el TXA₂ se forma a partir del AA via enzimática catalizada por la COX-1 y la TX sintasa¹³⁷. El TXA₂ es liberado desde las plaquetas adheridas para amplificar la adhesión plaquetaria al unirse a los receptores TPα y TPβ. Esto implica cambios conformacionales en las plaquetas y un aumento de la agregación plaquetaria¹³⁷. La prostaciclina es la responsable de inhibir la actividad procoagulante del TXA₂, regulando por tanto la trombogénesis.
- c) Trombina: Esta molécula está producida en la superficie de las plaquetas activadas por el factor tisular y está relacionada con la producción de fibrina y fibrinógeno; constituye el agonista plaquetario más potente que es capaz de activar la cascada de la coagulación a dosis muy bajas^{135,136}. La trombina activa a las plaquetas mediante la estimulación del receptor activado proteásico (PAR)-1¹²⁷. La liberación de ADP y TXA₂, de las plaquetas adheridas favorece el reclutamiento de plaquetas circulantes y condiciona los efectos de la activación plaquetaria que incluyen la modificación de forma de las plaquetas y un incremento en la expresión de moléculas proinflamatorias,

como la P selectina, la expresión de la actividad procoagulante plaquetaria y la activación del receptor GP IIb/IIIa^{123,127}. La activación plaquetaria mediada por la trombina contribuye a la formación de un trombo rico en plaquetas, pudiendo no ser necesaria en la hemostasia protectora^{140,141}. En la hemostasia parece más importante la acción de la trombina en la obtención de fibrina a partir del fibrinógeno¹⁴². La activación de las plaquetas mediante la trombina está regulada principalmente por el receptor PAR1 de las plaquetas para la trombina.

- d) Colágeno: el colágeno subendotelial es un potente sustrato trombogénico. Los receptores GP Ib α y GP IIb/IIIa interaccionan directamente con el colágeno a través del factor de von Willebrand. Ante una situación de alto estrés oxidativo el factor de von Willebrand interacciona con el GP Ib α , activándose el GP IIb/IIIa, estabilizándose los agregados de plaquetas. En ausencia de estrés oxidativo el colágeno sirve como sustrato adhesivo para las plaquetas vía receptores GP Ia/IIa ($\alpha 2\beta 1$ integrina) y GP VI de la superficie de la plaqueta. Por otro lado, el colágeno constituye un estímulo para la liberación del calcio, lo que induce la actividad procoagulante de las plaquetas. Este último constituye el receptor más importante para el colágeno implicado en la adhesión, agregación, degranulación y coagulación¹²³.
- e) Serotonina: Esta sustancia vasoconstrictora se une a los receptores 5HT-2A y amplifica la respuesta plaquetaria al estimular el cambio conformacional de las plaquetas al atraer más plaquetas al sitio lesionado¹³⁷. Es posible que además tenga un papel procoagulante al promover la retención de fibrinógeno y trombospondina en la superficie de la plaqueta¹⁴³.

Por otro lado, la activación plaquetaria también va encaminada a la síntesis de eicosanoides. Para ello se activa una superfamilia de enzimas: las FLasa A₂. La FLasa A₂ se encarga de hidrolizar los ácidos grasos de la posición sn-2 de los FL de membrana, que generalmente contienen AGP, y que cuando se liberan son metabolizados formando eicosanoides y otros mediadores lipídicos¹⁴⁴.

Las FLasa A₂ pertenecen a una gran familia consistente en varias subfamilias como las FLasa A₂ secretadas (sFLasa A₂), sFLasa A₂ citosólicas (csFLasa A₂), sFLasa A₂ no dependientes de calcio (isFLasa A₂), y sFLasa A₂ asociadas a los lípidos oxidados de las

lipoproteínas y relacionadas con el factor activador de plaquetas. Cada una de ellas está implicada en distinta medida en el metabolismo lipídico y en la progresión de la enfermedad.

Entre las citosólicas se encuentra la cFLasa A₂ α ¹⁴⁵, que es de gran interés por tener alta afinidad por los FL que llevan AA en la posición sn-2 y por lo tanto se le considera la enzima responsable de la liberación de AA. Por otro lado, la csFLasa A₂ es una enzima dependiente de calcio que parece estar relacionada con la dinámica de las fibras de actina y por lo tanto con la motilidad y el vertimiento de los gránulos de las plaquetas¹⁴⁶.

Los TX, PG y LT, son mediadores lipídicos que se forman a partir del AA liberado de los FL de membrana por acción de la FLasa A₂ y por acción de la lipooxigenasa^{147,148} (**Figura 8**), COX o el citocromo P450¹⁴⁹. Una vez en el torrente sanguíneo el TXA₂ se une a receptores de la superficie de las plaquetas, células inflamatorias circulantes y componentes de la placa aterosclerótica, acentuando aun más la lesión. Los eicosanoides desempeñan un papel clave en la fisiología de organismo, en patologías como el asma, hipertensión, cáncer y aterosclerosis.

La presencia de proteínas adhesión de los gránulos α , como la P-selectina, trombospondina, GPIIb/IIIa, FvW, fibrinógeno y fibronectina acentúan aún más esta fase de adhesión.

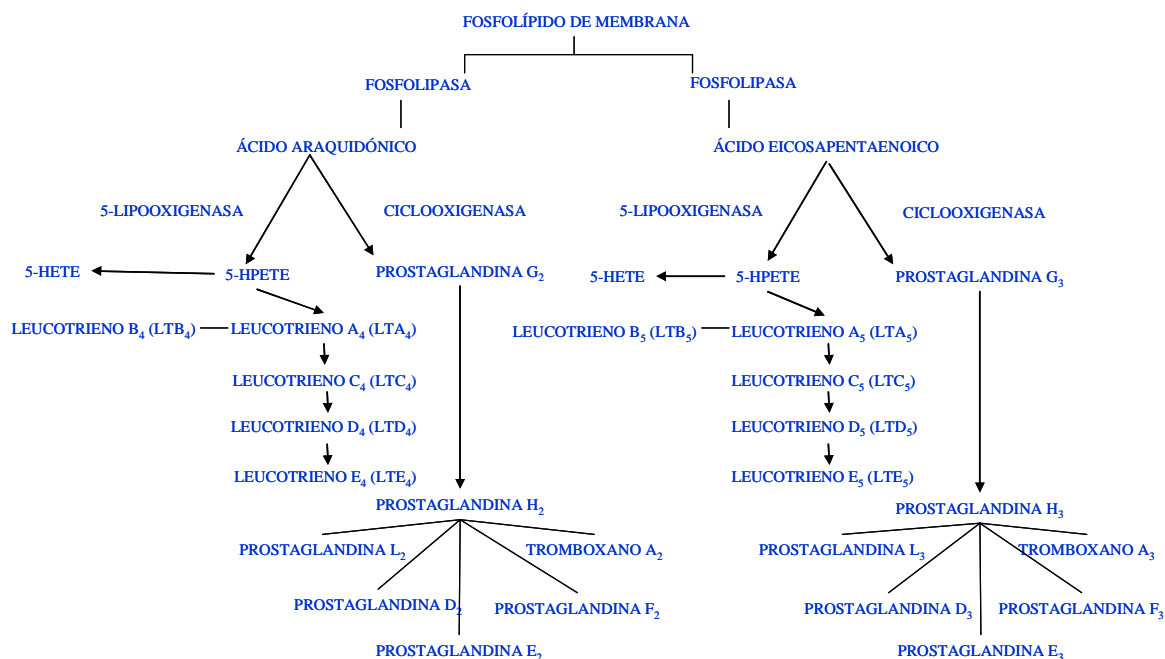


Figura 8.- Vías metabólicas del ácido araquidónico y del ácido eicosapentaenoico. Adaptado de Riccioni y col. 2009¹⁴⁷.

5-HPETE: ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico; 5-HETE: ácido 5-hidroxicotetraenoico

1.5.1.3 Agregación plaquetaria

La activación plaquetaria, provoca que la plaqueta cambie de forma, pasando de ser un disco plano a tener una configuración esférica. La nueva forma favorece la exposición de las fosfolipoproteínas ricas en fosfatidilserina, presentes en su superficie exterior, lo que induce la formación de trombina, retroalimentando el proceso. Por tanto, se favorece la producción de eicosanoides y la aparición de filamentos de fibrina -tanto en la parte exterior del trombo como en los huecos intersticiales- a la que mediante receptores específicos se unirá la trombina, haciendo el trombo de mayor tamaño.

El receptor GPIIb/IIIa, presenta dos unidades proteicas (IIb y IIIa) y constituye la proteína más abundante de la superficie plaquetaria. Cuando este receptor se activa se produce un cambio conformacional de las dos subunidades, dejando al descubierto el dominio para que puedan unirse a él ligandos, principalmente el fibrinógeno, tanto plasmático como plaquetario, el factor von Willebrand, fibronectina, vitronectina y el ligando CD40¹⁵⁰.

En la última fase de formación del trombo, el fibrinógeno se convierte en fibrina mediante la acción de la trombina, estabilizándose así los agregados plaquetarios. Además se suceden una serie de fenómenos que incrementan la activación y adhesión plaquetaria para estabilizar aun más el trombo formado. Se forma entonces un tapón plaquetario, que posee una estructura laxa que puede bloquear pequeñas hendiduras, pero es incapaz de hacerlo con las de mayor tamaño, lo que requiere la formación de un coágulo mayor y más resistente, en donde se requiere la presencia de fibras peptídicas de fibrina. Además en dicho tapón plaquetario se pueden encontrar células sanguíneas como neutrófilos y en ocasiones también monocitos.

Los fármacos responsables de inhibir la agregación plaquetaria actúan a diferentes niveles, así, el ácido acetilsalicílico bloquea la activación de la plaqueta y la conversión del AA a TX. Las tienopiridinas, ticlopidina y clopidogrel, inhiben el receptor de ADP que activa la plaqueta. Los bloqueantes de la glicoproteína IIb/IIIa, eptifibatide, tirofiban, abciximab, etc., ocupan el receptor e impiden la unión del fibrinógeno.

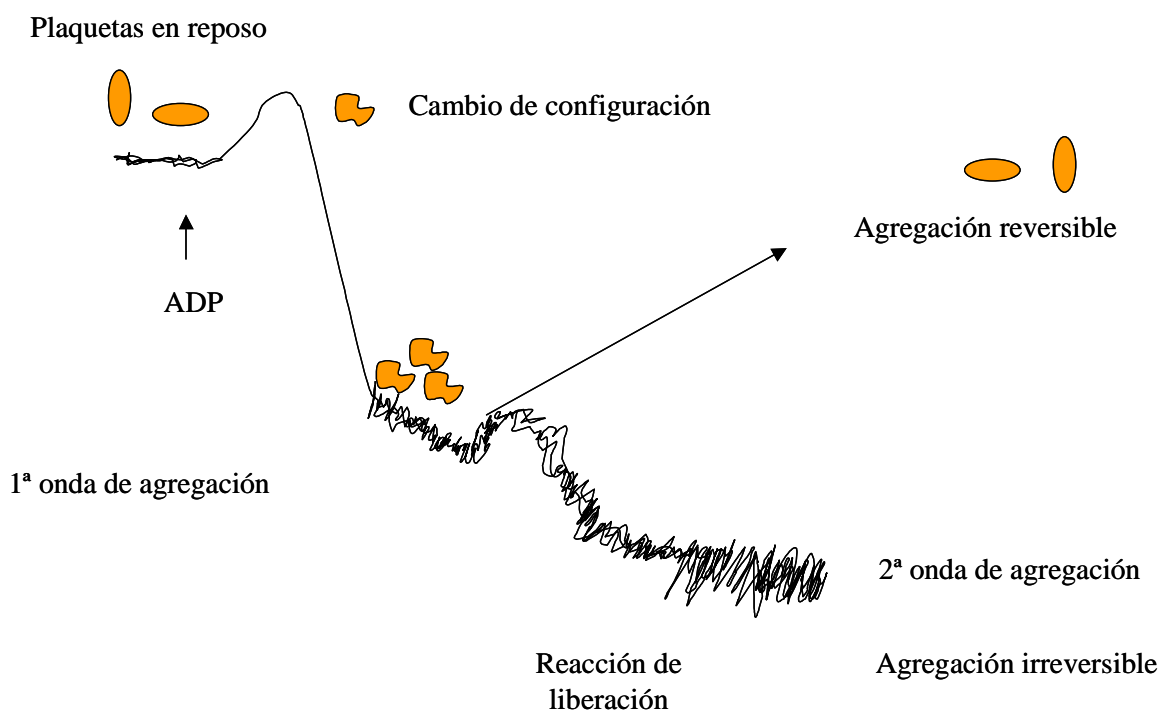


Figura 9.- Representación esquemática de la agregación plaquetaria *in vitro* utilizando ADP como agente agregante. Tomado de Gaetano¹⁵¹.

1.5.2 Influencia de la dieta sobre la agregación plaquetaria, y el metabolismo del AA y el equilibrio $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$

La dieta puede tener un efecto beneficioso en la prevención de las ECV. Está bien establecido que la agregación plaquetaria está modulada por la producción de dos eicosanoides: el TXA_2 y la PGI_2 y es el balance óptimo entre ellos el que determina el control de la agregación plaquetaria y la prevención de la trombosis¹⁵². Aunque no se conoce plenamente el mecanismo por el cual los AG influyen en la agregación plaquetaria, es sabido que los AG de la dieta modifican la composición de lípidos de las plaquetas y su función, alteran las lipoproteínas del plasma y la producción de eicosanoides¹⁵³. En este sentido es interesante señalar la posibilidad que tienen los AG de modular la vía de la COX, actuando como estimulantes o inhibidores de la síntesis de TX y PG y también la de las lipoxigenasas (LO) induciendo la formación de LT y otros factores.

En los sistemas biológicos, y en respuesta a una variedad de estímulos, los AGP linoleico y α -linolénico son convertidos a través de las reacciones de desaturación y elongación, en AGP de 20 átomos de carbono como el AA o el ácido eicosapentanoico (EPA), precursores de eicosanoides de la serie 3: PGI_3 y TXA_3 (Figura 8).

Los eicosanoides derivados de los AG de 20 carbonos son de la serie 1 en el caso del ácido dihomogammalinolénico (DHLA) (PGG_1 , PGH_1 , PGD_1 , PGE_1); de la serie 2 en el caso del AA (PGG_2 , PGH_2 , PGD_2 , PGI_2 , TXA_2) y de la serie 3 en el caso del EPA (PGG_3 , PGH_3 , PGD_3 , PGI_3 , TXA_3)¹⁵⁴. Es importante resaltar que las plaquetas presentan mecanismos insuficientes de desaturación necesarios para transformar, el ácido linoleico en AA o el ácido linolénico en EPA¹⁵⁵. No obstante, otros órganos como el riñón poseen tales enzimas y contribuyen de forma significativa a la concentración corporal de TX¹⁵⁶.

El TXA_2 es un potente vasoconstrictor y proagregante plaquetario mientras que el TXA_3 , derivado del EPA, es un débil proagregante y vasoconstrictor. Los endoperóxidos derivados del DHLA no son capaces de producir agregación plaquetaria. En cuanto a las prostaciclinas producidas a nivel de las células endoteliales, la PGI_3 para algunos autores, tiene una actividad antiagregante y vasodilatadora más potente que la PGI_2 ¹⁵⁷, mientras que Sorensen y Olsen¹⁵⁸ indican que ambas son equipotentes. La

PGD₂ es de 10 a 15 veces menos potente como inhibidora de la agregación inducida por AA, ADP y colágeno, que la PGE₁ y ésta de 20 a 30 veces menor que la PGI₂. La PGD₂ es producida por las plaquetas y a nivel de la célula endotelial. Lo mismo ocurre con la PGE₂ y la PGF₂α, pero en las plaquetas estas dos PG constituyen un pequeño porcentaje del metabolismo del AA. La PGE₁ se produce en condiciones particulares, como después de un tratamiento dietético con DHLA. La PGI₂ y la PGD₂ reconocen dos receptores distintos situados en las plaquetas humanas, mientras que la PGE₁ y PGE₂ tiene menor afinidad por el receptor de la PGI₂¹⁵⁹.

Los AGP n-3 están presentes en muy bajas concentraciones, tanto en la dieta como en la mayoría de las células corporales. Sus efectos sobre el metabolismo pueden ser estudiados por simple suplementación. Por el contrario, la presencia significativa de AA endógeno limita en gran medida el estudio de los efectos específicos de estos AG en la dieta.

La relación entre dietas ricas en AGS y agregación plaquetaria no está muy clara. Algunos estudios indican que este tipo de dietas inducen trombosis por aumentar la saturación de la membrana de la plaqueta, lo que la hace más sensible a la acción de los agentes agregantes¹⁶⁰. Tandon y col.¹⁶¹ estudiaron que un aumento de colesterol a nivel de la membrana plaquetaria, reducía su fluidez y aumentaba la expresión de receptores para agregantes como la trombina, mientras que Stuart y col.¹⁶² y Pinto y col.¹⁶³ relacionaron esta disminución en la fluidez de la membrana plaquetaria con un aumento de la hidrólisis de sus FL, sobre todo por parte de la FLasa A₂, liberándose AA y aumentando la producción de sus metabolitos. Por otro lado, Rolland y col.¹⁶⁴ observaron que un aumento del colesterol en la dieta disminuía la producción de PGI₂.

Muchos autores sugieren que el aumento en la agregación plaquetaria es el resultado de la hipercolesterolemia y/o hiperlipoproteínemia, la cual se produce a su vez por un consumo elevado de los AGS, situación que induce incremento de la reactividad plaquetaria. De hecho, estudios en animales¹⁶⁵ han demostrado que un aumento de colesterol plasmático da lugar a una mayor agregación plaquetaria frente ADP, trombina y TXA₂, aumentando también la producción de este último. Son muchos estudios los que examinan los efectos de los AG sobre la función plaquetaria, llegando a la conclusión de que los AGS estimulan la agregación en plaquetas humanas¹⁶⁶. Nuestro grupo encontró en un colectivo de religiosas que la agregación plaquetaria y la concentración de TXA₂ era mayor en las hipercolesterolémicas^{156,167} y que la sustitución

parcial de ácido oleico por palmítico indujo un incremento significativo de agregación plaquetaria y de TXA_2 ¹⁶⁶.

El ácido linoleico y otros AGP, ocupan la posición β en los FL de membrana, por lo que podrían ser liberados juntamente con el AA y así modular el efecto trombogénico de este último compitiendo con él por la COX o causando de forma irreversible la destrucción autocatalizada de dicha enzima¹⁶⁸. Otros autores como Ballou y Cheung¹⁶⁹ definen a los AGP como inhibidores de la FLasa A_2 en plaquetas humanas. Los estudios en humanos que relacionan la ingesta de ácido linoleico con cambios en la agregación plaquetaria y producción de eicosanoides son controvertidos. Algunos autores han encontrado que la ingesta de aceites vegetales con un alto contenido en ácido linoleico, tienden a disminuir la agregación plaquetaria, la producción de TXA_2 y el contenido de AA en plaquetas¹⁷⁰, debido quizás a que un incremento en la fracción fosfolipídica de ácido linoleico lleva asociado un decremento de AA. La ingesta en mujeres de ácido linoleico en la dieta (4,8-7,6% energía) dió como resultado una disminución en la síntesis de PGI_2 y PGE_2 debido a la inhibición de la actividad COX¹⁷¹. Srivastava¹⁶⁸ concluyó que el ácido linoleico inhibe a bajas concentraciones la COX, reduciendo tanto la formación de TXA_2 como de PG, pero a altas concentraciones, además de inhibir la COX, probablemente inhibe también la TX sintetasa y los endoperóxidos se desvían hacia la formación de PG, disminuyendo el TXA_2 y aumentando la PGI_2 . Estudios en sujetos hipercolesterolémicos han demostrado que los AGP n-6 reducen la reactividad de las plaquetas y la formación de TXA_2 , estimulada por trombina^{172,173}, mientras que en sujetos con hipertensión media a los que se administraron 39g/día de ácido linoleico, se observó una tendencia no significativa al aumento en la excreción de metabolitos de la PGI_2 , sin cambios en la excreción de TXA_2 ^{174,175}.

Oubiña y col.¹⁵⁶ encontraron que la concentración en orina de TXB_2 (metabolito estable del TXA_2) era menor durante el periodo en el que las mujeres voluntarias participantes tomaron aceite de oliva virgen que en el periodo de girasol con alto contenido en ácido oleico. Si bien ambos aceites tienen un perfil de AG similar, el aceite de girasol con alto contenido en oleico presentaba más ácido linoleico, lo que explicaría un mayor contenido de AA en las plaquetas durante dicho periodo dietético. No obstante, otros componentes de la dieta, como los polifenoles del aceite de oliva virgen extra, también podrían haber estado implicados en la menor reactividad de las plaquetas durante el periodo de aceite de oliva virgen extra¹⁵⁶. El mecanismo atribuido a

los AGP n-3, que mejor explica el efecto protector frente a ECV en poblaciones con elevado consumo de pescado, es su efecto antitrombótico y antiinflamatorio. El efecto antitrombótico de los AGP n-3 es debido a que por una parte favorecen la síntesis, a nivel plaquetario de TXA_3 , sustancia vasodilatadora y no proagregante, frente al TXA_2 , y por otra parte, a la síntesis de PGI_3 a nivel endotelial, con el mismo, si no mayor, efecto vasodilatador y antiagregante que la PGI_2 .

Debido a la competición de los AGP n-3 y n-6 por la incorporación a los FL celulares y por las enzimas que catalizan su conversión a eicosanoides, es importante resaltar que es el cociente n-6/n-3 en la dieta, antes que la cantidad absoluta de AGP n-3, sería el factor que determina la inhibición de la biosíntesis de eicosanoides a partir del AA. Nuestro equipo ha encontrado que el consumo de una dieta donde se incluye 5 veces por semana 150 g/día de cárnicos reestructurados conteniendo nuez conlleva una reducción en la agregación máxima, así como un incremento del tiempo para alcanzar dicha agregación, además de un descenso en la concentración de TXB_2 y un incremento de PGI_2 , lo que le confiere unas propiedades de protección frente al desarrollo de ECV¹⁷⁶.

Contrariamente al efecto del consumo de un cárnico enriquecido en pasta de nuez, Jeng y col.¹⁷⁷ encontraron que masticar nueces de areca induce agregación plaquetaria, probablemente debido a una activación local a nivel de las plaquetas de la mucosa oral, que conllevaría una liberación de factores de crecimiento (PDGF) de efecto fibrótico¹⁷⁸ y que el extracto de nueces de areca estimula la producción de TXB_2 , mediado probablemente por la COX o por la producción de H_2O_2 y ERO por los componentes de las nueces de areca.

1.5.3 Leucotrienos

Los LT al igual que los TX y PG se forman a partir del AA. La enzima que cataliza dicha conversión es la 5-lipooxigenasa (5-LO) (E.C.1.13.11.34)¹⁷⁹. La 5-LO a través de la proteína de activación de la 5-LO (FLAP)¹⁸⁰, genera un compuesto epóxido intermedio inestable, el LTA_4 , que es precursor del LTB_4 , del LTC_4 y otros cistenil LT¹⁷⁹.

Los LT ejercen su efecto biológico mediante la activación de receptores específicos acoplados a proteínas G^{181,182,183}.

Los neutrófilos y monocitos/macrófagos son los principales formadores de LTB₄¹⁶⁴. El LTB₄ es un factor quimioatrayente que facilita la llegada y adhesión de leucocitos a la lesión endotelial, así como su paso a través del endotelio. De hecho, el LTB₄ es el estímulo más potente para los leucocitos¹⁸⁴. La interacción se establece a través de receptores¹⁸⁵. Hasta la fecha se han identificado dos de esos receptores, uno de gran afinidad para el LTB₄, el BLT₁ y que se expresa en leucocitos y es un mediador quimiotáctico¹⁸⁶ y el BLT₂ de baja afinidad para el LTB₄ que se une a otros eicosanoides y que carece de una ubicación específica^{187,188}.

Por otra parte, el efecto antiinflamatorio de los AGP n-3 se debe a la competencia por la enzima LO, que conlleva una disminución de la formación de LTB₄, de reconocida acción sobre polimorfonucleares y linfocitos circulantes.

Además, se generan otros mediadores, las lipoxinas, encargadas de la fase de resolución de la inflamación. Se pueden sintetizar mediante tres vías diferentes: i) cuando las plaquetas y los leucocitos entran en contacto, la 12-LO humana convierte el LTA₄ en lipoxina A₄ y lipoxina B₄, a través de esta interacción las plaquetas se convierten en una fuente rica de lipoxinas. ii) a partir de la 15-LO en monocitos y eosinófilos lo que conduce a la activación de reguladores de la inflamación, la IL-4 y la IL-13^{189,190} que estimulan células que generan ácido 15S hidroxieicosatetraenoico (15-S-HETE), que se convertirá en lipoxinas vía 5-LO de monocitos y neutrófilos¹⁹¹ y iii) a través del ácido acetil salicílico que inhibe la acción de la COX-2 para la formación de PG a través del AA, pero que permite la formación de 15-R-HETE, que vía la 5-LO generará 15 epilipoxinas¹⁹².

El efecto que ejercen las lipoxinas se opone al efecto proinflamatorio de los LT, siendo por tanto un efecto orientado a disminuir la inflamación y las reacciones quimiotácticas de los neutrófilos.

Es importante resaltar, que aunque a fecha de hoy, todavía se disponen de pocos datos, la enzima 5-LO muestra polimorfismo genético. Está codificada por la región ALOX5, que comprende 14 exones y 13 intrones de aproximadamente 82kb en el cromosoma 10¹⁹³.

Por otra parte, el efecto antiinflamatorio de los AGP n-3 se debe a la competencia por la enzima LO, que conlleva una disminución en la formación de LTB₄, de reconocida acción sobre polimorfonucleares y linfocitos circulantes. A partir del EPA presente en los FL de membrana, se induce la formación de LT análogos a los

procedentes del AA, pero con un doble enlace más en la molécula del LT de la serie 5 (Figura 8). Estos LT de la serie 5 son mucho menos quimioatrayentes que los LT de la serie 4, por lo que explicarían, a menos en parte, los efectos beneficiosos en la ECV del consumo de AG ω -3. Además es conocido que el EPA es peor sustrato que el AA para la 5-LO¹⁹⁴ contribuyendo a una menor producción global de LT.

1.6 Nueces

Ya en la antigüedad los frutos secos constituían una importante fuente de energía para la humanidad. A pesar de su riqueza en lípidos presentan una vida larga vida útil, ya que almacenados en un sitio fresco y seco dentro de su cáscara tienen una vida media de aproximadamente un año. Aunque su origen parece situarse en Asia, en la actualidad, su consumo se ha extendido a lo largo de la cuenca mediterránea y a América del Sur.

El Código Alimentario Español¹⁹⁵ define a los frutos secos como aquellos frutos cuya parte comestible posee en su composición menos de un 50% de agua. En España, los frutos secos se consumen principalmente como aperitivo, aunque también se pueden encontrar en repostería y la cocina de diseño los incluye en sus platos.

De la amplia gama de frutos secos disponibles, centraremos nuestra atención en las nueces. Éstas se obtienen del nogal (*Juglans nigra* de la familia de las juglandáceas), árbol del que se han encontrado evidencias históricas en Persia que datan del 7000 AC¹⁹⁶. El estudio de Rabia¹⁹⁷ aporta datos del Walnut Marketing Board del uso de las nueces en Estados Unidos, que se resume en un 49% en bollería, un 25% en aperitivos, un 11% en platos culinarios, un 11% en ensaladas y un 4% en helados.

1.6.1 Composición nutricional de los frutos secos

A pesar de la diversa procedencia botánica de los frutos secos, se pueden establecer propiedades comunes en cuanto a su composición. En general todos los frutos secos tienen un alto contenido energético (5,3-6,6 kcal/g) y son ricos en AG (0,51-0,73 g/100g)¹⁹⁸, sin embargo, las nueces se diferencian del resto de frutos secos ya que éstas últimas son ricas en AGP (ácido linoleico y α -linolénico), mientras que el resto lo son en AGM (ácido oleico). De hecho, el contenido en AGM y AGP constituye aproximadamente un 90% del total, mientras que los AGS tan solo constituyen un 7%

del total de los AG siendo el más abundante el ácido esteárico que se considera no hipercolesterolemizante porque una vez en el organismo se transforma fácilmente en ácido oleico¹⁹⁹.

En cuanto a la composición proteica de los frutos secos es peculiar, ya que son ricos en el aminoácido arginina, siendo la relación lisina/arginina inferior a uno, incluso menor que la de la soja, lo que es beneficioso para reducir el colesterol plasmático²⁰⁰. Así mismo, la arginina es precursora del NO²⁰¹ un potente vasodilatador endógeno, antiinflamatorio e inhibidor de la agregación plaquetaria²⁰², que explica, al menos parcialmente, por qué las nueces ejercen protección CV.

En cuanto al contenido en hidratos de carbono cabe decir que es bastante bajo y en su mayoría complejos²⁰³. Los frutos secos también son ricos en fibra, aproximadamente entre 5-9% de su peso, predominando la forma insoluble (3,7-8,6g/100g) frente a la soluble (0,1-0,2g/100g) y siendo comparativamente superior a la de las frutas y verduras frescas²⁰³.

Entre los minerales destacan Mg, K, Ca, Se, Cu y Zn. La relación Zn/Cu ha sido ampliamente estudiada a nivel CV, de forma que los frutos secos presentan un cociente Zn/Cu muy positivo de 5/1 o superior²⁰⁴. A su vez, constituyen una fuente considerable de Vitamina E (**Tabla 4**), sobre todo las almendras y avellanas (20 mg/100 g), que actúa sinérgicamente en sus efectos antioxidantes con el selenio²⁰⁵, y otros componentes con actividad biológica como los polifenoles, entre los que resalta la quercetina con importante efecto protector CV ya que cantidades comprendidas entre 16 y 24 mg/día inhiben la agregación plaquetaria y reducen la síntesis de TX²⁰⁶. El ácido fólico presente en las nueces (100g de nueces aportan el 16% de la RDA), ayuda a mantener unos niveles de homocisteína en sangre de forma adecuada, por lo que también ofrece protección CV. Entre los esteroides vegetales destacan en general en las nueces el β -sitosterol y el γ -tocoferol^{207,208}.

Tabla 4.- Composición cuantitativa y cualitativa de los frutos secos. Adaptado de Nus y col.¹⁹⁸.

	Cacahuete	Avellana	Almendra	Nueces de macadamia	Nuez	Pistacho
Equivalentes de retinol (ng)	333,3	4,8	20	Nd	8	25
Carotenoides totales (μg)	2	29	120	Nd	48	150
β- carotenos (μg)	2	29	120	Nd	48	150
Vitamina E (mg)	11	26,3	26,1	Nd	6	5,2
Tocoferoles totales (mg)	18,7	28	27,2	Nd	43,5	5,2
α- tocoferol (mg)	10	26,1	25,89	Nd	1,9	5,2
β- tocoferol (μg)	270	Nd	163	Nd	Nd	Nd
γ- tocoferol (μg)	8,3	9	873	Nd	41,4	Nd
δ- tocoferol (μg)	170	Nd	20	Nd	200	Nd
Vitamina B1 (μg)	900	390	220	280	340	690
Vitamina B2 (μg)	155	210	620	120	120	200
Nicotinamida (mg)	15,3	1,4	4,2	1,5	1	1,5
Ácido pantoténico (mg)	2,70	1,15	580	Nd	820	Nd
Vitamina B6 (mg)	440	313	155	Nd	870	Nd
Biotina (μg)	34	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Ácido fólico (μg)	169	71	43	Nd	77	58
Vitamina C (μg)	Nd	3	Nd	Nd	2,6	7

1.6.2 Efectos de las nueces sobre el perfil lipoproteico

Los estudios de intervención en humanos para evaluar el efecto de las nueces sobre diversos marcadores de ECV, realizados por Sabaté y col.²⁰⁹, Abbey y col.²¹⁰, Cischolm y col.²¹¹, Zambón y col.²¹², Almario y col.²¹³ conllevan las siguientes conclusiones:

- Su elevado contenido en AGP (n-6, linoleico y n-3, α-linolénico) las distingue de otros frutos secos que básicamente sólo contienen AGM. A pesar de su alto contenido calórico derivado de su contenido graso presentan bajos niveles de AGS.
- El consumo de nueces como parte de la dieta habitual no implica una ganancia neta de peso.
- Aunque los datos no son concluyentes, los estudios coinciden en que la ingesta diaria de una pequeña cantidad de nueces parece reducir el riesgo CV, al disminuir el colesterol sanguíneo y el transportado por las LDL.

El estudio de Prevención con Dieta Mediterránea (Predimed)²¹⁴, con el objetivo de estudiar el síndrome metabólico y basándose en la dieta mediterránea analizó los efectos del consumo de aceite de oliva, frutos secos y una dieta baja en grasa en voluntarios con riesgo CV incrementado. En dicho estudio se ha observado una marcada disminución de

la prevalencia de síndrome metabólico en los pacientes que ingirieron una ración diaria de frutos secos, en comparación con los que siguieron una dieta pobre en grasa, mientras que la reducción observada en los pacientes que ingirieron aceite de oliva no fue tan importante²¹⁴. Además el efecto beneficioso de la ingesta de frutos secos resultó ser independiente de factores como el sexo, edad, obesidad basal o cambios en el peso corporal, destacando como novedad el hallazgo de una mejora en el síndrome metabólico debido únicamente a la dieta, sin ser necesaria una modificación del peso corporal o en la actividad física.

La Food and Drug Administration (FDA) ha aceptado que el consumo diario de aproximadamente 20 g de nueces en el marco de una dieta pobre en AGS tiene efectos protectores bajo el punto de vista de la ECV²¹⁵.

1.7 Carne

La carne siempre ha sido un alimento muy apreciado para el hombre. En el Paleolítico un tercio de los alimentos provenía de la caza de animales salvajes y dos tercios de alimentos de origen vegetal. Hace 10000-12000 años el hombre empezó a domesticar animales y a desarrollar la agricultura, al principio sólo en determinadas zonas como Mesopotamia o China. Con los años esta tradición se extendió por todo el mundo, aumentando de forma importante el consumo de carne.

En España, desde 1964 el consumo de carne ha ido creciendo, de forma que en 2003 el consumo de carne fue mucho mayor que el consumo de cualquier otro alimento (77g/persona y día en 1964 frente a 185g en 2003), calculándose que para 2030 habrá tenido lugar un progresivo aumento en el consumo de dicho alimento²¹⁶.

1.7.1 Composición

Los principales componentes de la carne son agua (60-80%), proteínas (16-25%, de alto valor biológico: un 40% de sus aminoácidos son esenciales) y grasa (1-30%). Sin embargo estas proporciones varían dependiendo del animal, edad, sexo, alimentación y zona anatómica analizada²¹⁷. En cantidades pequeñas se aprecian sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, creatina, nucleótidos, etc), hidratos de carbono, ácido láctico, minerales (Fe hemo y Zn de alta biodisponibilidad) y

vitaminas (tiamina, niacina, retinol y vitaminas B₆ y B₁₂). A su vez contiene otros minerales como Cu, Mg, Se, Co, P, Cr y Ni²¹⁸.

Desde 1980, la imagen de la carne como alimento saludable cambió a raíz de la relación de la grasa saturada y colesterol como factores de riesgo ateroesclerótico²¹⁹. En cuanto a los AGS los predominantes son el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0) que constituye un 16-20% del total de los AG, y el mirístico (C14:0) que aunque es el más aterogénico²²⁰, se encuentra en menor cantidad. El ácido oleico (C18:1) representa un 40% del total de AG de la carne. Los AGP aparecen en pequeña proporción siendo el linoleico (C18:2) el predominante (0,5-7%), seguido del α -linolénico ($\leq 0,5\%$).

La carne de rumiantes presenta AG *trans* que se forman durante la biohidrogenación en el rumen. Se sabe que los AG *trans* tienen gran potencial aterogénico, sin embargo no son igual de dañinos para la salud los AG *trans* de las grasas hidrogenadas que se utilizan en la bollería industrial que los que aparecen de forma natural en la leche o en la carne de rumiantes²²¹. En estos últimos alimentos se encuentran cantidades apreciables del conjugado del ácido linoleico (CLA). Así, en la carne de rumiantes hay 1,2-6,2mg/g de grasa en vacuno; 14,9mg/g en cordero australiano; y en los lácteos, 0,001-4,3mg/g de grasa²²². Aunque a fecha de hoy no está bien definido el papel protector CV de los diferentes isómeros del CLA, hay indicios que apuntan a que puede ser un factor protector de ciertas enfermedades crónicas como las CV²²³ y más recientemente de obesidad, aunque los resultados siguen siendo controvertidos en humanos²²⁴.

Por otro lado, dado que la carne es una buena fuente de hierro biodisponible (hierro hemo), su efectividad en mantener el estatus del hierro en el organismo está demostrada²²⁵. Recientemente nuestro grupo también ha revisado el papel controvertido del hierro en la ECV, ya que tanto la deficiencia como el exceso de hierro en el organismo está relacionada con incremento del riesgo CV²²⁶.

La carne no ha sido considerada como una fuente de vitamina D, sin embargo estudios recientes que incluyen el metabolito 25(OH)D que tiene una actividad biológica 5 veces superior a la del calciferol, muestran que la carne contiene cantidades superiores que las que se creía²²⁷.

1.8 Alimentos funcionales

Durante los últimos años la Ciencia de la Nutrición ha adquirido especial relevancia, dada la aceptación científica del papel de la nutrición en la salud, y en la disminución de la incidencia de enfermedades degenerativas. Por ello se ha pasado de una nutrición adecuada a una nutrición óptima, basada en la optimización de la calidad de la ingesta diaria en términos de nutrientes y no nutrientes²²⁸.

El origen moderno de los alimentos funcionales se sitúa en Japón a mediados del siglo XX. En 1990 el ministerio Japonés de Salud y Bienestar emitió un decreto por el que se aprobaban los Alimentos de Uso Específico para la Salud²²⁹. Estos alimentos denominados FOSHU están constituidos por alimentos de los que se espera que ejerzan un efecto beneficioso específico sobre la salud, como resultado de determinados constituyentes activos, o aquellos alimentos a los cuales se les ha suprimido sus componentes alergénicos. Un requisito para ser considerado producto FOSHU es presentarse en forma de alimentos habituales y no como comprimidos o cápsulas²³⁰.

En la actualidad, el concepto de alimento funcional coincide en términos generales con el de FOSHU y constituye un campo que se encuentra en pleno crecimiento y maduración. En 1994 la American Dietetic Association (ADA) demostró su apoyo para el estudio de los alimentos funcionales. En Diciembre de 2006 se acuñó la primera legislación europea sobre declaraciones saludables en base a reglamentar la información que debe incluirse en el etiquetado (Reglamento del Parlamento europeo 1924/2006 de 20 de diciembre de 2006 y modificaciones posteriores). Hasta la fecha se han diferenciado declaraciones o alegaciones de tipo nutricional, de complementos alimenticios, de nuevos alimentos y nuevos ingredientes y de salud.

Según Salmerón²³¹ Se trata de cualquier declaración que afirma, sugiera o de a entender que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas específicas con motivo de a) el aporte energético que proporciona o proporciona a un nivel reducido o incrementado; b) Los nutrientes o sustancias que contiene, o no contiene en cantidades reducidas o incrementadas, existiendo información concreta a la que las declaraciones nutricionales legalmente reconocidas deben ajustarse. Las declaraciones de salud pueden ser genéricas o específicas de producto o innovadoras. Las primeras se basan en consenso de la comunidad científica sobre propiedades de un componente o ingrediente particular (p.e. la proteína de soja puede contribuir a reducir el colesterol

LDL; la fibra alimentaria puede ayudar a mantener la salud intestinal). Las alegaciones específicas de producto o “innovadoras” dan a entender que el producto causa ciertos efectos fisiológicos (p.e. El producto X puede contribuir a reducir el colesterol LDL; el producto Y puede ayudar a mantener la salud intestinal).

Un alimento puede considerarse funcional si reúne los criterios acordados en los proyectos FUFOSE²³² y PASSCLAIM^{233,234,235} y por lo tanto se demuestra satisfactoriamente mediante biomarcadores que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo²³³ y/o es capaz de reducir el riesgo de enfermedad.

En términos generales, un alimento funcional se obtiene a partir de un alimento tradicional mediante alguno de los siguientes procedimientos: 1) eliminación de un componente con efectos fisiológicos negativos, 2) aumento de la concentración de un componente con efectos fisiológicos beneficiosos, 3) adición de un componente con efectos fisiológicos beneficiosos; 4) sustitución parcial de un ingrediente con efectos negativos por otro con efectos fisiológicos beneficiosos y/o 5) combinación de algunos, o de todos, los puntos anteriores.

1.8.1 Cárnicos funcionales

Como ya se ha comentado la carne es un alimento que reúne numerables cualidades beneficiosas para la salud, pero a su vez, una ingesta excesiva de carne se ha relacionado con un incremento del riesgo cardiovascular y otras enfermedades degenerativas debido a su contenido en AGS y en menor medida al de colesterol.

Un cárnico será funcional si:

- mejora la dieta y la salud
- sus beneficios nutricionales y saludables o de sus ingredientes específicos se fundamenten en una base científica sólida
- su ingrediente funcional es un producto natural
- la cantidad apropiada de ingesta esté establecida por expertos
- no es nocivo por encima de la ingesta aconsejada
- el ingrediente funcional está caracterizado por sus propiedades físicas y químicas valoradas a través de metidos analíticos detallados y por su presencia cualitativa y cuantitativa en el cárnico

-
- el ingrediente no reduce su valor nutritivo.

1.8.2 Efectos buscados por el consumo de cárnicos funcionales

Los cárnicos funcionales pretenden influir positivamente en funciones selectivas y respuestas biológicas del organismo como por ejemplo:

- Regular el crecimiento, desarrollo y maduración. Por ello sería interesante considerarlos en las fases de crecimiento fetal, del lactante, en la infancia y durante el embarazo²²⁸.
- Regular el metabolismo de los macronutrientes y en particular la homeostasis del peso corporal. La inclusión en la carne de triglicéridos de cadena media y los sustitutivos y miméticos de grasa entre otros, reduce el contenido energético. La inclusión de fibra soluble y fermentable, el CLA, etc., ayudarían a mantener el peso corporal a través de diversos mecanismos²³⁶.
- Defensa contra el estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno están implicadas en el envejecimiento celular y en muchas enfermedades degenerativas como las CV, el cáncer, las cataratas, etc., por eso la obtención de cárnicos ricos en antioxidantes (tocoferoles, ácido ascórbico, carotenos, carotenoides, selenio, cinc, cobre, etc.) pueden contribuir al mantenimiento de las defensas antioxidantes endógenas, mantener la integridad de las membranas celulares, evitar la peroxidación de las lipoproteínas de membrana y de las proteínas funcionales y estructurales²³⁷.
- Actuar a nivel CV. La elaboración de cárnicos (p.e. conteniendo nueces, esteroides de plantas, fibra dietética soluble) con un óptimo equilibrio de AG n-3/n-6/n-9 conllevaría niveles apropiados de lipoproteínas, favorecería la integridad arterial, evitaría la hipertensión, la excesiva agregación plaquetaria y la activación de células inflamatorias, aspectos cruciales en la enfermedad aterosclerótica²²⁹.
- Modificar las funciones gastrointestinales con objeto de regular los procesos de absorción, tránsito, actividad y calidad de la flora colónica, formación y eliminación de las heces. Para ello se recomienda la inclusión de hidratos de carbono fermentables, de simbióticos y prebióticos que potencian las bifidobacterias y disminuyen la flora coliforme.

- Actuar sobre funciones conductuales y psicológicas. La inclusión de cafeína, colina, AG esenciales, vitaminas del grupo B mejoraría el rendimiento cognitivo²²⁸.
- Efectos sobre el rendimiento y mejora del estado físico. La inclusión de hidratos de carbono de determinado índice glucémico, ciertas proteínas y otras sustancias ergogénicas como la carnitina ayudaría a alcanzar un rendimiento óptimo o mejorado del ejercicio físico.

1.8.2.1 Cárnicos funcionales con nueces

Como ya se ha señalado los estudios de intervención proponen un consumo regular de frutos secos debido a sus innumerables propiedades derivadas de su composición en AG, fibra, vitaminas, minerales, fitoesteroles y polifenoles. Sin embargo, el consumo de frutos secos y de nueces en particular, es escaso. La FDA propone que se consuman 190g de nuez por semana aproximadamente o 27g de nuez al día²¹⁵.

Por eso se han estudiado estrategias para incrementarlo, entre las que destaca su inclusión en alimentos de consumo frecuente (quesos, carnes, embutidos, chocolates)²³⁸. Se han estudiado los procedimientos por lo que se pueden modificar los productos cárnicos con el propósito de convertirlos en alimentos funcionales^{239,240}. La carne es apta para la inclusión de nutrientes o sustancias beneficiosas para la salud así como para la eliminación de aquellas sustancias intrínsecas nocivas, lo que la convierte en una mejor opción en comparación con otros alimentos. El equipo del Profesor Jiménez Colmenero del Instituto del Frío ha desarrollado y elaborado cárnicos funcionales (filetes y salchichas) que contienen nuez con propiedades sensoriales y fisicoquímicas adecuadas. El auge de los productos cárnicos reestructurados se debe en parte al enorme abanico de posibilidades de desarrollo para la industria cárnica^{241,242,243}.

Los cárnicos funcionales constituyen un grupo de alimentos aptos para el consumo humano, de aspecto similar a la carne original y que se comercializan en presentaciones habituales (filetes, salchichas, reestructurados) y que se pueden procesar. Su consumo puede orientarse a la población en general o a unos colectivos en particular, ya que permiten la incorporación de determinados ingredientes (por ejemplo, nueces) y compuestos bioactivos, que les brindan unas características adicionales. Los cárnicos reestructurados se preparan mediante la adición de sal y fosfato, para obtener una óptima cohesión^{242,244}. Se venden congelados o precocinados, ya que en estado crudo

las fuerzas cohesivas de las partículas son insuficientes²⁴¹. La inclusión de nueces es un hecho novedoso y que por tanto requiere un análisis de los efectos en humanos. Como veremos más adelante la finalidad de esta Tesis Doctoral es conocer los posibles efectos beneficiosos del consumo de cárnicos con nuez, en dosis compatibles con el consumo diario, y en una población con riesgo CV incrementado sobre aspectos relevantes, pero poco estudiados bajo el punto de vista CV (p.e. agregación plaquetaria, producción de antioxidantes y eicosanoides).

2 INTERÉS DEL ESTUDIO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Interés del estudio

Actualmente, se han ido estableciendo nuevas relaciones entre diversos procesos patológicos (p.e. ECV) y los ERO²⁴⁵ y entre AG de la dieta, la lipemia y la trombogénesis. Teniendo en cuenta la fuerte asociación dieta-enfermedad, la sociedad demanda productos que además de un valor nutricional le aporten beneficios a su estado de salud. Por ello, la búsqueda de sustancias antioxidantes que puedan disminuir la formación y los efectos de estas moléculas reactivas, así como el diseño de dietas y alimentos con un perfil más correcto en AG y componentes bioactivos constituye hoy en día una línea de investigación y actuación muy importante.

La evidencia científica disponible hasta la fecha señala que algunos componentes de la nuez muestran acción antioxidante, así como efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipoproteico y agregación plaquetaria y trombogénesis, lo que, dado el origen y naturaleza de las ECV (ver Revisión bibliográfica, sección 1), presenta interés indiscutible en la prevención y tratamiento de las mismas. Por ello, resulta de gran interés crear un alimento, que a la vez de ser atractivo para el público, contribuya a mejorar su calidad de vida y estado de salud. Si además, el nuevo alimento procede de otro de gran consumo, y mejora su composición y características bajo el punto de vista nutricional y de la salud, el valor añadido del producto será indudable. Parece por tanto evidente que utilizar una matriz cárnica para incluir un alimento de reconocido prestigio nutricional y CV –como la nuez- resulte de gran interés a la industria cárnica en particular, y a la ciencia de la nutrición en general. Además, el consumo de cárnico funcional enriquecido en pasta de nuez, debido a su valor nutricional, contribuiría a aumentar la oferta de alimentos para la población mundial y población con riesgo CV incrementado.

2.2 Hipótesis

El cárnico funcional enriquecido en pasta de nuez constituye un alimento de buena palatabilidad y cuyo consumo disminuye el riesgo CV a través de influir positivamente sobre diferentes marcadores de riesgo: agregación plaquetaria, trombogénesis, niveles de VCAM-1, ICAM-1, LPO, LDL-ox, colesterol sérico, y antioxidantes endógenos en

población con riesgo CV incrementado. Esto le confiere características de alimento funcional con especial relevancia en la prevención y tratamiento de tales enfermedades.

2.3 Objetivos

Teniendo en cuenta el reciente aumento de la demanda de alimentos funcionales, el incremento del consumo de carne y derivados cárnicos y el bajo consumo de frutos secos, esta Memoria de Tesis Doctoral tiene como objetivo prioritario estudiar en voluntarios con riesgo CV incrementado el efecto del consumo de derivados cárnicos potencialmente funcionales conteniendo un 20% de pasta de nuez sobre diferentes biomarcadores de riesgo CV. Este objetivo se plantea teniendo en cuenta las directrices de la FDA sobre consumo de nueces para reducir el riesgo CV²⁴⁶, de forma que el consumo del cárnico funcional proporcione aproximadamente 150g de nuez por semana (equivalente al consumo de 19,4g de nuez al día), es decir, el 70% de lo que sugiere la FDA.

Este objetivo general se aborda a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar en una muestra de voluntarios con riesgo CV incrementado los efectos funcionales, potencialmente beneficiosos del consumo 5 veces a la semana de derivados cárnicos enriquecidos en pasta de nuez. Se utilizarán biomarcadores empleados en la práctica clínica habitual (colesterol total, cLDL, cHDL, ácido úrico, tensión arterial), así como otros marcadores sensibles a cambios dietéticos y asociados con riesgo CV (agregación plaquetaria, producción de eicosanoides [ej. Tromboxano A₂ (TXA₂), prostaciclina I₂ (PGI₂), leucotrienos B₄ (LTB₄)], estatus antioxidante [ej. Catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), paraoxonasa-1 (PON1)], moléculas de adhesión [ej. molécula de adhesión celular vascular (VCAM-1) y molécula de adhesión celular intracelular (ICAM-1)].

2. Analizar en dichos voluntarios la posible interacción dieta-genética que se produce sobre los niveles de los biomarcadores de riesgo CV previamente citados, considerando el efecto del consumo de cárnico enriquecido en nuez frente al de cárnico control en portadores de polimorfismos de los genes de la PON1 y de la APO AIV.

3 SUJETOS Y MÉTODOS

3.1 Preparación de los reestructurados cárnicos

La preparación de los cárnicos objetos de estudio se realizó en la planta experimental del Instituto del Frío del CSIC (Madrid)²⁴⁷. De forma resumida dichos cárnicos fueron preparados a partir de 40kg de carne de vacuno, a la que se le despojó de grasa, nervios y tejido conectivo, siendo posteriormente troceada en tiras de aproximadamente 5 a 20 cm. Se empaquetó en lotes al vacío de 2,5 kg, que se congelaron a -37°C hasta su utilización.

Por otro lado, las nueces (La Morella Nuts, S.A., Tarragona, España) se molieron y refinaron por calentamiento a 80°C durante una hora hasta alcanzar un tamaño de 12 mm.

Cada paquete de carne se descongeló durante 18h a una temperatura de 3-2°C, hasta alcanzar -3 a -5° y se mezclaron durante 1 minuto en una batidora (Mainca, Granollers, España) con sal (1,5%), trifosfato de sodio (0,5%), agua y enfriado a 2°C. Posteriormente se añadieron las nueces y se mezcló toda la masa durante 2 minutos, alcanzando una temperatura final inferior a 10°C. Cada lote se mezcló en vacío durante 1 hora (Inject Start1 MC 20, Hollstein & Fuhrmann GmbH, Wien, Austria) en una habitación a 3°C. Los lotes se moldearon en moldes de jamón (1250g) durante 20 horas a 3°C para permitir un equilibrio y la extracción proteica soluble. Las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso. Las muestras congeladas se rebanaron en filetes (134±3 g, 1.0 ±0,05 cm de grosor) para su evaluación.

Los productos potencialmente funcionales tenían que contener una alta proporción de pasta de nuez y fueron diseñados de tal forma que 150g de filetes o salchichas aportarían sobre un 70% de las ingestas aconsejadas diarias de nuez para reducir el riesgo CV²⁴⁸. Esto sería equivalente, como ya se ha indicado, a consumir diariamente 19,4 g de nuez.

3.2 Sujetos

Se eligieron 22 voluntarios, de los 144 candidatos reclutados a través de anuncios insertados en los medios de comunicación, página Web de la Fundación Española de la Nutrición, y expuestos en el Hospital Puerta de Hierro de Madrid y en la Escuela de

Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, en base a que cumpliesen una serie de criterios:

- edad: hombres ≥ 45 años y mujeres ≥ 50 años y posmenopáusicas
- índice de masa corporal (IMC): $25 \leq 35 \text{ kg/m}^2$

Además tenían que reunir alguno de los siguientes requisitos

- colesterol sérico total $\geq 5,69 \text{ mmol/L}$
- fumadores (≥ 10 cigarrillos / día)
- hipertensos (tensión sistólica $\geq 140 \text{ mm Hg}$ y/o tensión diastólica $\geq 90 \text{ mm Hg}$)
- consumidores preferentes de carne \geq de 5 veces/semana

Se excluyeron aquellos candidatos con hipercolesterolemia familiar monogénica, diabetes tipo I, y los que se medicaban con hipocolesterolemiantes, antihipertensivos, antiinflamatorios y terapia hormonal. También se excluyeron aquellos voluntarios que no consumían carne con regularidad (< 5 veces por semana), a pesar de que reunían varios factores de riesgo CV. Veintidós voluntarios fueron rechazados debido al consumo de medicamentos para otras patologías. También se excluyeron del estudio 3 voluntarios que no cumplieron con las extracciones de sangre necesarias.

El estudio se realizó tras su aprobación por el Comité Ético del Hospital Universitario Puerta de Hierro (Madrid, España) siguiendo la Declaración de Helsinki, tal y como se indica en las directrices del Proyecto Científico Tecnológico AGL 2001-2398-C03. Todos los voluntarios firmaron el consentimiento informado antes de comenzar el estudio.

3.3 Diseño del estudio

Se diseñó un estudio cruzado, controlado con placebo en el que se distribuyeron los voluntarios aleatoriamente en dos periodos experimentales de cinco semanas cada uno, durante las cuales los voluntarios ingirieron el cárnico funcional o el cárnico control, manteniendo sus hábitos dietéticos habituales. El periodo de lavado entre ambos ensayos fue de cuatro a seis semanas, duración que se consideró adecuada, dado que la dieta es capaz de inducir cambios estables en los lípidos de las lipoproteínas a las 4 semanas²⁴⁹, y que la vida media de las plaquetas circulantes es inferior a 2 semanas²⁵⁰. Durante el periodo del cárnico enriquecido en pasta de nuez (WM), los voluntarios

ingirieron cada semana cuatro raciones de 150g cada una de filetes reestructurados y una ración de 150g de salchichas, todas ellas conteniendo 20% de pasta de nuez, mientras que durante el periodo control ingirieron cada semana las mismas cantidades de cárnico reestructurado y salchichas, pero elaborados a partir de una carne con muy poca grasa y sin pasta de nuez (LM). La composición exacta de dichos derivados cárnicos ha sido publicada por Serrano y col.²⁴⁷. Los participantes fueron fuertemente aleccionados para evitar el consumo de cualquier otro tipo de carne durante el estudio.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Control y estudio dietético

Los participantes del estudio recibieron congelados, al principio de cada semana, los derivados cárnicos WM y LM. Con el propósito de tener información precisa de la dieta, los voluntarios llevaron un minucioso registro de alimentos, raciones y frecuencias de consumo que posteriormente nuestro grupo analizó y verificó mediante un sistema informatizado que contenían datos nutricionales sobre alimentos basado en las tablas de Moreiras y col.²⁵¹. De forma adicional, se midieron las concentraciones de γ -tocoferol en plasma, como biomarcador de exposición, para corroborar que los pacientes habían consumido el cárnico WM²⁵². A pesar, del sabor a nuez del WM, al 80% de los voluntarios les pareció aceptable y les agradó su consumo, mientras que un 20% de los voluntarios comentó sobre la baja palatabilidad del LW. La **Tabla 5** muestra el consumo diario de macronutrientes y AG durante los dos periodos de estudio.

Tabla 5.- Ingesta diaria (% de energía) de macronutrientes y ácidos grasos de los periodos de estudio.

	Intervención	Control
Energía (MJ)	7721 ± 1244	7419 ± 1202
Carbohidratos (% En)	30.1 ± 7.9	32.5 ± 5.7
Proteínas (% En)	18.4 ± 3.11	19.1 ± 3.3
Grasa (% En)	47.3 ± 6.9	47.3 ± 6.9
AGS (% En)	12.6 ± 2.8 a	16.2 ± 5.9 b
AGM (% En)	19.2 ± 4.8	19.9 ± 6.1
AGP (% En)	13.0 ± 2.7 a	7.2 ± 3.5 b
Colesterol (mg)	371.2 ± 152.1	359.75 ± 136.1
Fibra (g)	13.4 ± 5.8	13.4 ± 4.7

Los resultados son la media ± desviación estándar de 22 voluntarios. Valores en la misma fila con letras distintas son significativamente diferentes.

3.4.2 Medidas antropométricas y de tensión arterial

Personal cualificado y entrenado midió el peso, talla, tensión sistólica y diastólica de cada participante al comienzo del estudio y transcurridas 3 y 5 semanas de cada periodo experimental.

Para la determinación del peso se utilizó una báscula BAME®, sobre cuya plataforma los pies del sujeto -descalzo, con el mínimo de ropa posible y en ayunas-, ocupaban una posición central y simétrica. La estatura se midió con un estadiómetro, con el sujeto en bipedestación, descalzo y lo más erguido posible, los talones unidos a los ejes longitudinales de ambos pies y guardando entre sí un ángulo de 45°. El IMC se calculó mediante la relación: peso (kg)/talla (m²).

Se clasificó a los pacientes en función del IMC en base a los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS)²⁵³ sobrepeso: $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} \leq 30 \text{ kg/m}^2$ y obesidad: $30 \text{ kg/m}^2 \leq \text{IMC} \leq 35 \text{ kg/m}^2$.

Las tensiones arteriales sistólica y diastólica se midieron a primera hora de la mañana con el sujeto en reposo, con un esfigmomanómetro calibrado. Las mediciones se realizaron por duplicado, siempre en el mismo brazo.

3.4.3 Recogida de muestras

Las muestras sanguíneas se recogieron con los voluntarios en ayunas, entre las 7:30 y las 10:00 horas am, al comienzo de cada periodo y transcurridas 3 y 5 semanas de cada periodo de intervención. Se obtuvieron entre 20 y 30 mL de sangre mediante el empleo de tubos “vacutainer”. El suero se obtuvo por centrifugación inmediata tras su recolección de las muestras de sangre a 1.500 g a 4°C.

Por otro lado, se mezclaron las muestras de sangre con una solución de citrato trisódico al 3,8% (9:1 (V/V) sangre/citrato) y se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos para la obtención del plasma rico en plaquetas (PRP). El recuento de plaquetas se hizo en las muestras de PRP diluidas en solución salina mediante cámara hemocitométrica. Se ajustó el número de plaquetas a 300.000/mm³ mediante solución salina.

3.3.3.1 Preparación de los hemolizados de eritrocitos

A partir de muestras de sangre citratada y centrifugada a 1.000 g durante 10 minutos a 4°C se obtuvieron eritrocitos, los cuales se lavaron por triplicado con una solución de PBS (pH 7, que contenía 140 mM de cloruro de sodio). Tales eritrocitos se hemolizaron con agua a 4°C, manteniendo los tubos en baño de hielo. Alícuotas de suero, plasma y hemolizados de eritrocitos se conservaron a -80°C hasta su análisis. El contenido de hemoglobina (Hb) se determinó mediante el método de la cianometahemoglobina²⁵⁴. Los hemolizados de eritrocitos se usaron para determinar las actividades enzimáticas de la catalasa (CAT) y de la superóxido dismutasa (SOD) así como las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) y el Índice Redox.

3.4.4 Colesterol sérico y en lipoproteínas

Los niveles de colesterol en el suero se determinaron mediante el método enzimático-colorimétrico de Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania).

3.4.5 Ácido úrico

El ácido úrico se determinó mediante el test (Stanbio LiquiColor Ácido Úrico-PAP, Boerne, Texas, EEUU) en muestras de suero a las que previamente se les había añadido hidróxido de sodio al 10%, para evitar la hidrólisis del ácido úrico. Consiste en la determinación enzimática cuantitativa colorimétrica del ácido úrico presente en el suero, sobre el que actúa la uricasa para formar peróxido de hidrógeno y alantoína^{255,256}. El H_2O_2 es leído cuantitativamente en un espectrofotómetro UVIKON 930 (Kontron Instruments Ltd., Watford, Herts, U.K.) por su reacción con el ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzosulfónico en presencia de peroxidasa y 4 aminofenazona, para formar un complejo de color rojo violeta.

3.4.6 Actividad paraoxonasa (PON1)

La actividad PON1 se determinó a través de la reacción de hidrólisis del paraoxon en p-nitrofenol, catalizada por la enzima a 37°C y 405nm según el método de Tomás y col.²⁵⁷.

Al inicio del estudio se preparó en campana una solución de paraoxon 5mmol/L, que se dividió en alícuotas y congeló a -80°C para evitar la hidrólisis espontánea del paraoxon a temperatura ambiente. Se realizó un control interno a partir de una mezcla de cincuenta sueros diferentes obtenidos de la Escuela de Perfeccionamiento Profesional de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, que también se congelaron en alícuotas a -80°C. Se midió la absorbancia de las muestras en función del tiempo en un espectrofotómetro UVIKON 930 (Kontron Instruments Ltd., Watford, Herts, Reino Unido), para obtener una cinética que se comparó con la del control interno. Una unidad de actividad PON1 se define como 1 μ mol de p-nitrofenol formado por litro y por minuto. Cada medida se realizó por duplicado.

3.4.7 Genotipado de la paraoxonasa (PON1)

Se extrajo DNA de células sanguíneas utilizando el kit Ultraclean Bloodspin (MoBio Laboratorios Inc, Carlsbad, California, EEUU). El genotipado de las muestras para PON1 se realizó mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)²⁵⁸. Esta técnica se basa en propiedad natural de la polimerasa del DNA para replicar hebras de DNA, mediante ciclos de altas y bajas temperaturas alternados que permiten separar las hebras de DNA recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación. El tipo de PCR realizada fue multiplex, en la cual se amplifica más de una secuencia en una misma reacción, lo que permite obtener información de varios *loci* en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos y una rápida construcción de la base de datos, para poder genotipar con mayor precisión. La amplificación de los fragmentos de DNA 111 y 144 kpb se realizó mediante la PCR para PON1-Q192R y PON1-L55M, respectivamente. Los reactivos se adquirieron a Promega (Madison, EEUU) y la PCR se llevó a cabo de forma automatizada usando un termociclador (Mastercycler-ep380®, Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.4.8 Genotipado de la APO AIV

Para la amplificación de la región de la APOA4 en el DNA extraído de células sanguíneas se utilizó PCR mediante el kit Ultraclean Bloodspin (MoBio Laboratorios Inc, Carlsbad, California, EEUU). Según el método descrito por Hixson y Powers²⁵⁹, la PCR se llevó a cabo con DNA genómico 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de dNTPs, y 0,6 mM de cada primer oligonucleótido en un volumen final de 25 µL. El producto de la amplificación de 309-bp se testó con la enzima de restricción PvuII para distinguir entre los alelos APOA4 360Gln y 360His. Los voluntarios homocigotos para el alelo His se clasificaron como APOA4-1 y los que los portadores del alelo Gln como APOA4-2. Los reactivos se adquirieron a Promega (Madison, EEUU) y la PCR se llevó a cabo de forma automatizada usando un termociclador (Mastercycler-ep380®, Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3.4.9 Lipoperóxidos (LPO)

La medida de la LPO se realizó empleando una alícuota de suero, usando el kit comercial Bioxytech LPO-586™ kit (Oxis Research, Portland, EEUU). El ensayo se basa en la reacción de un reactivo cromogénico, el N-metil-2-fenilindol, con el malonaldehído y/o el 4-hidroxi-alqueno, generados por los AGP cuando se descomponen²⁶⁰. Se incubaron las muestras a 45°C durante 40 min, de forma que dos moléculas del N-metil-2-fenilindol reaccionaron con el malonaldehído o con el 4-hidroxi-alqueno formando un cromóforo estable, cuya producción se determinó a 586 nm.

3.4.10 Agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria se indujo en muestras de PRP ajustadas con solución salina a 300,000 plaquetas/mm³, usando ADP (Chromopag ADP. IZASA, España) como agente agregante. Se cuantificó en un agregómetro electrónico (modelo 500, Chronolog Corporation, IZASA-Coulter, Havertown, PA), siguiendo el método de Cardinal y Flower²⁶¹. Los datos de agregación plaquetaria se expresan como el máximo de agregación alcanzada en 5 minutos (cm/5 min) y el tiempo para alcanzar la máxima agregación plaquetaria (min).

3.4.11 Eicosanoides (TXB₂, PGI₂ y LT)

Tanto el TXB₂, metabolito estable del TXA₂, como la 6-ceto-prostaglandina (PG) F_{1α}, metabolito estable de la PGI₂, se extrajeron de las muestras de plasma citratado mediante el empleo de microcolumnas de silica (Chromabond® C18) acopladas a un sistema de vacío (Manifold Vacuum Gauge Controller; J.T. Baker, Phillipsburg; N.J. EEUU)²⁶². Tras la extracción a pH 3, se reconstituyó una alícuota del residuo seco con el tampón del ensayo para la determinación de TXB₂ (TXB₂/2,3-Dinor-TXB₂(¹²⁵I) RIA kit Izotop, Budapest, Hungría) y otra alícuota para el ensayo de PGI₂ (6-ceto-PGF_{1α}/2,3-dinor-6-ceto-PGF_{1α} (¹²⁵I) RIA kit Izotop). Dichos ensayos se fundamentan en la competitividad que se produce en la muestra entre el eicosanoide marcado que se añade y el eicosanoide sin marcar de la muestra biológica. La radioactividad de las muestras se

midió con el contador auto-gamma Packard Mod Cobra (Packard Instrument Company, Inc., Packard-Becker B.V.; BK Groningen, Holanda).

La misma muestra extraída en las columnas de silica se empleó para la determinación de LTB₄. Dicho leucotrieno se cuantificó mediante un test de enzima inmunoensayo (Leukotriene B₄ Enzyme Immunoassay Kit Assay designs EEUU). Este método permite la unión de un anticuerpo policlonal de manera competitiva al LTB₄ de la muestra, de forma que tras dos horas de incubación se detiene la reacción enzimática y se lee a 405nm en un espectrofotómetro la concentración del LTB₄. Los resultados se extrapolan a los de una curva de calibración.

3.4.12 Proteínas totales eritrocitarias

La valoración de las enzimas antioxidantes se expresa en función de las proteínas totales del contenido intracelular de los eritrocitos. Las medidas de proteína se realizaron por duplicado, siguiendo el método de Bradford²⁶³ adaptado por Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay EEUU) en un espectrofotómetro. La cantidad de proteínas de la muestra se calculó por extrapolación en una recta de calibrado obtenida con un patrón de albúmina bovina sérica (BSA).

3.4.13 Actividad catalasa (CAT) en eritrocitos

La actividad enzimática se midió a partir de la descomposición de peróxido de hidrógeno incorporado a las muestras biológicas. La cinética de descomposición se determinó en un espectrofotómetro UVIKON 930 (Kontron Instruments Ltd., Watford, Herts, Reino Unido) midiendo la variación de absorbancia a 240 nm al reaccionar la muestra con peróxido de hidrógeno 15 mM en tampón fosfato²⁶⁴.

Una unidad de actividad enzimática de la CAT se define como la cantidad de enzima que descompone un micromol de peróxido de hidrógeno por minuto, bajo condiciones específicas de temperatura (25°C) y pH (7,4). Los resultados se expresan como unidades de actividad CAT.

3.4.14 Actividad superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos

La cuantificación de los niveles de SOD en los hemolizados de los eritrocitos se realiza mediante la técnica del 1,2,3-bencenotriol o pirogolol²⁶⁵ que consiste en la inhibición de la autooxidación de este fenol. Las muestras reaccionan con pirogolol 12mM (en ácido clorhídrico 10mM) que se autooxida originando pirogalina, un compuesto amarillo, y radical superóxido que autocataliza la oxidación del pirogolol. La cinética de aparición del producto de la autooxidación del compuesto se registra durante 1 min a 420nm y a 25°C. La diferencia en el incremento de la absorbancia entre los controles y las muestras que contienen SOD, es expresada como el porcentaje de inhibición de la oxidación. Una unidad de actividad enzimática de SOD se define como la cantidad de solución de pirogolol que resulta inhibida en un 50%²⁶⁵.

3.4.15 Estatus antioxidante, concentración de glutatión en eritrocitos (GSH, GSSG y GSH/GSSG)

El contenido de glutatión total eritrocitario, se determinó mediante un ensayo fluorimétrico²⁶⁶, adaptado para placa de 96 pocillos, siendo el O-ftaldialdehído la sonda fluorescente empleada. La concentración del glutatión reducido (GSH) en la muestra del hemolizado de eritrocitos se obtuvo adicionando O-ftaldialdehído a dicha muestra, que reacciona con el GSH. Tras la incubación de dicha mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos, protegida de la luz, se mide la fluorescencia originada a una longitud de onda de excitación de 350nm y de emisión de 420nm.

Previa a la medición de los niveles de glutatión oxidado (GSSG), es necesario añadir N-etilmaleimida al hemolizado de eritrocitos para que se forme un complejo estable GSH- N-etilmaleimida, de forma que los niveles de GSH no interfieran en la medición de la concentración de GSSG. A continuación, se procede de la misma forma que para el GSH.

3.4.16 Moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1)

Las concentraciones de las moléculas de adhesión sICAM-1 y sVCAM-1 en las muestras de suero almacenadas a -80°C, se midieron mediante la técnica de ELISA, con la ayuda de los kits comerciales BLK 4-201 y BLK 4-232, respectivamente (Bio-Link,

Glebe, Australia). Las muestras se incubaron usando el kit respectivo, el cual portaba un anticuerpo monoclonal específico para cada molécula de adhesión. Posteriormente en cada placa se midió la longitud de onda de los productos coloreados resultantes frente a una curva patrón, calculándose las concentraciones de las moléculas de adhesión.

3.5 Estudio estadístico

Los resultados se analizaron mediante test de medidas repetidas comparando los efectos del consumo del cárnico WM frente al del cárnico LM. La comparación entre los dos tipos de cárnicos o de las dietas consumidas por los voluntarios se realizó mediante la *t* de Student no pareada.

El efecto de dos variables (p.e. ser portador de una variante polimórfica de un gen y el tratamiento) y su interacción también se cuantificó mediante el test de medidas repetidas, estudiando posteriormente los efectos netos del tratamiento para cada polimorfismo. El tamaño muestral se consideró adecuado asumiendo que el estudio sería capaz de detectar diferencias de un 30% entre los efectos debidos al consumo de ambos tipos de carne en un biomarcador (TX o PON1) con un poder estadístico del 85% suponiendo una SD promedio del 25% en el biomarcador a estudiar. Los datos se estudiaron con el programa SPSS 15.0, considerando significación estadística para $P < 0,05$.

4 EXPOSICIÓN DE RESULTADOS/PUBLICACIONES

Los resultados más relevantes de esta Tesis se han publicado en revistas indexadas en el Journal Citation Report. No obstante, también se presentan otros resultados aun no publicados o pendientes de ser enviados para su publicación.

En primer lugar, se incluye una publicación donde se compendian los resultados más relevantes hasta ahora publicados en este tema y obtenidos por nuestro grupo de investigación en colaboración con los otros dos grupos que participaron en el Proyecto AGL 2001-2398, el Instituto del Frío y el Hospital Puerta de Hierro de Madrid.

Por su relevancia actual en el campo de las ECV, se publicó una revisión sobre la enzima paraoxonasa 1 (PON1). También se presentan datos generales sobre los efectos del cárnico enriquecido en pasta de nuez sobre la capacidad antioxidante eritrocitaria *in vivo* de los voluntarios y frente al control sobre la agregación plaquetaria y trombogénesis. Aún sin publicar se discuten datos de los efectos del consumo de tales cárnicos sobre las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 y sobre la concentración de LT.

La interacción dieta-genética se presenta en dos publicaciones donde se analizan los efectos de los polimorfismos de la Apo AIV sobre la agregación plaquetaria y trombogénesis y de la PON1 sobre diferentes enzimas y sustratos antioxidantes.

4.1 PUBLICACIÓN nº 1

Diseño y desarrollo de alimentos cárnicos funcionales con pasta de nuez: tecnológico, nutricional e impacto para la salud.

Autores: Francisco Jiménez-Colmenero; Francisco J. Sánchez-Muniz; Begoña Olmedilla-Alonso

Colaboradores: Josune Ayo; José Carballo; Susana Cofrades; Claudia Ruiz-Capillas; Asunción Serrano; Sara Bastida; Juana Benedí; Amaia Canales; Josana Librelotto; Meritxell Nus; Inmaculada Blanco-Navarro; Silvia Blázquez-García; Fernando Granado-Lorencio; Carmen Herrero-Barbudo.

Food Chemistry (2010) 123: 959-967

Resumen:

La relación dieta-salud, ha llevado a la aparición de los llamados alimentos funcionales. La idea de utilizar los alimentos para fines de salud y no sólo como fuente de nutrientes, abre un nuevo campo en la industria de la carne. Además de las presentaciones tradicionales, existen sistemas mediante los cuales la industria de la carne puede modificar la composición tanto cualitativa como cuantitativa de la carne y los componentes de los productos cárnicos para producir alimentos de diseño con propiedades específicas. Esto implica orientar factores de calidad asociados a las propiedades del producto (sensorial y tecnológica, higiene, comodidad, estabilidad, etc.), su valor nutritivo (composición equilibrada y presencia de sustancias bioactivas) y sus efectos sobre las funciones fisiológicas y la salud. Este artículo revisa un modelo integral para el desarrollo alimentos funcionales derivados de la carne a partir de trabajo realizado y los resultados obtenidos en términos de diseño y de desarrollo cualitativa y cuantitativamente de productos cárnicos (a través de la reformulación) en los nutrientes asociados con el riesgo cardiovascular (empleando nueces como fuente de sustancias bioactivas). También se discute su biodisponibilidad y el efecto de su consumo sobre marcadores de riesgo cardiovascular en los seres humanos.

4.2 PUBLICACIÓN nº 2

Paraoxonasa, ¿algo más que una enzima?

Autores: Canales A, Sánchez-Muniz FJ.

Medicina Clínica de Barcelona (2003) 121: 537-548

Resumen:

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la primera causa de muerte en los países desarrollados. La hipótesis de la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) como mecanismo desencadenante del proceso ateroesclerótico, ha promovido estudios a fin de conocer los sistemas de que dispone el organismo para incrementar la defensa antioxidante y por tanto frenar la puesta en marcha de la aterosclerosis. Entre ellos se encuentra la enzima paraoxonasa. Esta enzima está principalmente relacionada con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y parece contribuir al mantenimiento y recuperación de la estructura y estado oxidativo de las LDL. En el presente trabajo se revisan los mecanismos implicados en la inducción y acción de esta enzima, así como el lugar de su producción, los aspectos moleculares que la ligan a las HDL y las modificaciones por factores externos. La aplicación de técnicas genéticas, el descubrimiento de diferentes polimorfismos de esta enzima, la posibilidad de incrementar mediante farmacoterapia y/o dietoterapia la actividad paraoxonásica ofrece nuevas perspectivas de actuación a la hora de tratar y prevenir las ECV.

4.3 PUBLICACIÓN nº 3

Efecto del consumo de carne reestructurada enriquecida en pasta de nuez sobre el estatus antioxidante de pacientes con sobrepeso u obesos con al menos un factor de riesgo cardiovascular.

Autores: Canales A, Benedí J, Nus M, Librelotto J, Sánchez-Montero JM, Sánchez-Muniz FJ.

Journal of American College of Nutrition (2007) 26: 225-232

Resumen:

Antecedentes: Numerosos estudios recientes indican que los antioxidantes reducen el estrés oxidativo asociado con el desarrollo de enfermedades coronarias (CHD). Objetivo: (i) Investigar si las enzimas eritrocitarias catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), el glutatión total, el glutatión reducido (GSH), el glutatión oxidado (GSSG), la peroxidación lipídica (LPO), el ácido úrico y la paraoxonasa-1 (PON1) se modifican por el consumo de un cárnico reestructurado enriquecido en pasta de nuez (WM), en pacientes con riesgo de enfermedad CHD elevado y ii) evaluar si dichos cambios fueron influenciados por el efecto del colesterol total, el índice de masa corporal y el consumo de tabaco.

Diseño: Estudio cruzado, controlado con placebo en el que 22 voluntarios (60% con sobrepeso y 40% obesos) con aumento del riesgo de CHD fueron asignados aleatoriamente para recibir WM o la carne control (CM) durante dos períodos diferentes de 5 semanas.

Resultados: Todas las enzimas y sustratos analizados, salvo el colesterol HDL, el ácido úrico y la LPO, se vieron afectados de forma significativa por la interacción tiempo*tratamiento ($p<0,05$). El tratamiento aumentó significativamente la actividad de la CAT, y las concentraciones del glutatión total y GSSG ($p<0,05$). Al final del período del cárnico WM, se observó un aumento en los niveles de glutatión total, interacción significativa género*tiempo*tratamiento ($p=0,043$), en hombres, pero no cambia en las mujeres. El glutatión total y el índice GSH/GSSG ($p<0,05$) fueron inferiores en los

fumadores. Los hipercolesterolémicos mostraron niveles superiores de ácido úrico ($p < 0,05$), pero las actividades enzimáticas o las concentraciones de sustratos no difirieron de las de los normocolesterolémicos.

Conclusiones: La WM estudiada puede considerarse un alimento funcional, ya que mejora el estado antioxidante de los voluntarios con riesgo CHD. A pesar de su alto contenido energético, también parece adecuada para el sobrepeso y las personas obesas, dado que no ejerce efecto negativo sobre el peso corporal.

4.4 PUBLICACIÓN nº 4

Variación del estatus antioxidante debido al consumo de un cárnico bajo en grasa y de otro enriquecido en pasta de nuez en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado en función de los genotipos PON1 55 y 192

Autores: Amaia Canales, Francisco J. Sánchez-Muniz, Meritxell Nus, Sara Bastida, Josana Librelotto, Marisa Guillen, Dolores Corella, Juana Benedi

Enviada para su publicación a British Journal of Nutrition en julio 2010. Ms: BJN-2010-015515 en revisión.

Resumen:

El consumo de un cárnico enriquecido en pasta de nuez (WM) implicó una respuesta en el estatus antioxidativo variable en los participantes del estudio. La oxidación lipoproteica y el riesgo de enfermedad cardiovascular fue diferente en función de los polimorfismos PON1 192 (Q/R) y 55 (L/M). En base a que el polimorfismo PON1 puede afectar el estatus antioxidante, este estudio pretende comparar los efectos del consumo del WM frente a un cárnico control bajo en grasa (LM) sobre las actividades catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y paraoxonasa 1 (PON1), los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en 22 voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado portadores de diferentes PON1 192/55 polimorfismos.

Estudio cruzado con placebo, con dos periodos experimentales de 5 semanas de duración cada uno durante los que se compararon los efectos sobre el estatus antioxidante del consumo de LM y WM en voluntarios con alto riesgo de enfermedad cardiovascular. Los portadores QQ mostraron actividades más elevadas de CAT ($P=0,009$), SOD ($P=0,019$), y PON1 ($P=0,001$) y niveles de GSH ($P=0,013$) y GSSG ($P=0,003$), mientras que los portadores QR+RR exhibieron actividades SOD ($P=0,020$) y PON1 ($P=0,040$) superiores con el WM que con el LM después de 5 semanas. El consumo de WM en comparación con el de LM incrementó todos los sustratos y actividades enzimáticas ($P<0,01$) y disminuyó ($P=0,050$) la relación SOD/PON1 en los portadores LM+MM pero sólo la actividad PON1 ($P=0,002$) en los portadores LL. El índice redox ($P=0,044$) y la concentración de LPO ($P=0,045$), y niveles de GSH

($P=0,049$) y GSSG ($P=0,047$) se vieron afectadas por la interacción del tratamiento con los genotipos PON1 192 y PON1 55 respectivamente. La respuesta antioxidante al WM frente a la ingesta del LM varía en función de los polimorfismos PON1. El incremento en la respuesta antioxidativa fue mayor en los portadores PON1 192QQ frente a los PON1 55M.

4.5 PUBLICACIÓN nº 5

Agregación plaquetaria, producción de eicosanoides e índice trombogénico en individuos con riesgo cardiovascular elevado consumiendo carne enriquecida en pasta de nuez. Estudio cruzado y controlado con placebo

Autores: Canales A, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Benedi J.

British Journal of Nutrition (2009) 102: 134-141

Resumen:

El consumo de nueces produce efectos cardiovasculares beneficiosos. El objetivo del presente estudio es el de comparar los efectos del consumo de carne enriquecida en pasta de nuez (WM) con los de una carne control baja en grasa (LM) sobre la agregación plaquetaria, la producción de tromboxano A₂ (TXA₂, medido como TXB₂), la prostaciclina I₂ (PGI₂, como 6-ceto-PGF_{1α}) y la relación trombogénica (TXB₂/6-ceto-PGF_{1α}) en voluntarios con alto riesgo de ECV. En un estudio cruzado, controlado con placebo, 22 voluntarios (60% con sobrepeso y 40% obesos) con aumento del riesgo de enfermedad coronaria fueron asignados aleatoriamente para recibir WM o LM durante dos períodos diferentes de 5 semanas, separados por un periodo de lavado de 4 a 6 semanas. La agregación plaquetaria, la concentración de TXB₂ y de 6-ceto-prostaglandina PGF_{1α} y la relación TXB₂/6-ceto-PGF_{1α} se determinó al inicio del estudio y en las semanas 3 y 5 para los dos períodos de la dieta. La dieta de WM contiene un menor contenido en AGS, una mayor concentración de AGP y una relación n-6/n-3 más favorable que la dieta LM.

La interacción tiempo*tratamiento resultó significativa para el TXB₂ (P=0,048) y la relación TXB₂/6-ceto-PGF_{1α} (P=0,028). La dieta rica en WM aumentó significativamente el nivel de 6-ceto-PGF_{1α} (P=0,037) y disminuyó relación TXB₂/6-ceto-PGF_{1α} (P=0,048). En la semana 5 se observaron diferencias significativas (P< 0,05) entre los tratamientos para la tasa de máxima agregación, los niveles de TXB₂ y la relación TXB₂/6-ceto-PGF_{1α}. Los efectos sobre los niveles de TXB₂ y de la relación TXB₂/6-ceto-PGF_{1α} fueron dependientes de la duración del tratamiento

($P=0.019$ and 0.011 , respectivamente). Ambas dietas WM y LM, redujeron de forma más marcada los niveles de TXB_2 ($P=0.050$) en los individuos obesos, mientras que la relación $TXB_2/6\text{-ceto-PGF}_{1\alpha}$ disminuyó más ($P=0.066$) en aquellos voluntarios con niveles de colesterol plasmático $\leq 220\text{mg/dL}$. La carne WM debe de ser considerada una carne funcional, porque mejora el estatus trombogénico, de forma más marcada en los individuos con niveles elevados de colesterol o índice de masa corporal elevado.

4.6 PUBLICACIÓN nº 6

El efecto del consumo de carne enriquecida en pasta de nuez sobre la agregación plaquetaria y la trombogénesis varía en voluntarios con diferente genotipo para la apolipoproteína A4.

Autores: A. Canales, J. Benedi, S. Bastida, D. Corella, M. Guillen, J. Librelotto, M. Nus, F.J. Sánchez-Muniz

Nutrición Hospitalaria (2010) 25: 746-754

Resumen:

Antecedentes y objetivos: La carne con bajo contenido graso (LM) se considera adecuada bajo el punto de vista cardiovascular. La ingesta de carne enriquecida en pasta de nuez (WM) mejora los efectos antitrombogénicos con una variabilidad inter-individual que puede estar relacionada con el polimorfismo genético. Variaciones polimórficas del gen de la Apo A4 (APOA4) afectan el riesgo cardiovascular. Este estudio compara los efectos de la ingesta de WM y LM sobre la agregación plaquetaria, la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaciclina I₂ (PGI₂), y el cociente TXA₂/PGI₂ ratio en 22 voluntarios con diferentes polimorfismos APOA4.

Material y Métodos: Seis voluntarios portaban el alelo Gln (APOA4-2) frente a los 16 homocigotos para el alelo His (APOA4-1). La agregación plaquetaria, el TXA₂ (medido como TXB₂), la PGI₂ (medida como 6-ceto-PGF_{1α}), y el cociente trombogénico (TXB₂/6-ceto-PGF_{1α}) se determinaron al comienzo y en las semanas 3 y 5 de los periodos de WM y LM.

Resultados: La agregación plaquetaria disminuyó significativamente más (P<0.05) en los voluntarios APOA4-1 que en los APOA4-2 en la semana 3 del periodo WM. El descenso de los niveles de TXB₂ fue mayor para los voluntarios APOA4-2 que para los APOA4-1 en la semana 5 del periodo WM. Después de 5 semanas con dieta WM, la concentración de TXB₂ y el cociente TXB₂/6-ceto-PGF_{1α} disminuyeron significativamente más (P<0.05) en los individuos APOA4-2 que en los APOA4-1 que con la dieta LM. Sin embargo, después de 5 semanas, la dieta WM con respecto a la LM

incrementó más ($P<0.05$) los niveles de 6-ceto-PGF1 α en los voluntarios APOA4-1 que en los APOA4-2.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la ingesta de WM en comparación con LM, disminuye más el riesgo trombogénico en los voluntarios portadores de Gln que en los que His/His.

4.7 PUBLICACIÓN nº 7.

VCAM, ICAM, y LTB4 y sus relaciones con la actividad PON-1 varía en sujetos con riesgo cardiovascular incrementado portadores de diferentes alelos de PON-1 y Apo A4 360 y consumiendo carne enriquecida en pasta de nuez.

Autores: Amaia Canales, Francisco J. Sánchez-Muniz, Sara Bastida, Josana Librelotto, Meritxell Nus, Dolores Corella, Marisa Guillen, Juana Benedi.

Este artículo no ha sido aun enviado para su publicación por lo que la revista en la que pudiera ser publicado tampoco ha sido seleccionada. No obstante se incluye un boceto del mismo siguiendo el esquema de otras publicaciones relacionadas.

Resumen:

En cuanto a la protección cardiovascular, el cárnico bajo en grasa debe de ser considerado adecuado. La ingesta de un cárnico enriquecido en nueces mejora los efectos antioxidantes y antitrombóticos. El riesgo cardiovascular depende de los polimorfismos de la paraoxonasa y de la apolipoproteína A4. Este estudio pretende comparar los efectos del consumo de un cárnico enriquecido en nuez, frente al de un cárnico bajo en grasa sobre moléculas de adhesión y otras moléculas quimiotácticas, como los leucotrienos, en 22 sujetos con riesgo cardiovascular incrementado. También se analizaron los polimorfismos PON1 55 y PON1 192, junto con el de la Apo A4 360. Estudio cruzado, controlado con placebo en el que se distribuyeron los voluntarios aleatoriamente en dos periodos experimentales de cinco semanas cada uno, separados por un periodo de lavado de 4 a 6 semanas. Durante un periodo los participantes ingirieron el cárnico enriquecido en nuez y durante el otro el cárnico bajo en grasa. La ingesta del cárnico con nuez en comparación con el cárnico bajo en grasa incrementó la actividad paraoxonasa ($p<0.001$) y disminuyó las moléculas de adhesión solubles intercelular y vascular ($p=0.046$, $p=0.012$ respectivamente), el leucotrieno B4 ($p=0.044$) y las relaciones cHDL/paraoxonasa-1 y Apo A1/paraoxonasa-1 (ambas, $p<0.001$). Las variaciones en la paraoxonasa se correlacionaron negativamente con la de la molécula

de adhesión intracelular ($r=-0.471$, $p<0.01$). La concentración de esta última fue inferior para los portadores PON1 55LM+MM, PON1 QQ192 y APOA4-2, mientras que la molécula de adhesión vascular fue menor para los portadores QR+RR y APOA4-1, mostrando efectos significativos en todas las relaciones relativas a los polimorfismos de la paraoxonasa. La ingesta del cárnico rico en nuez en comparación con la del cárnico bajo en grasa, disminuye la concentración de los biomarcadores quimiotácticos inflamatorios en función de la actividad paraoxonasa y sus polimorfismos, así como los de la apolipoproteína A4.

5 DISCUSIÓN INTEGRADORA

Este estudio es uno de los primeros en la bibliografía donde se incluye pasta de nuez en derivados cárnicos para su uso en la prevención CV. Por ello, en la discusión integradora se hace referencia a su ingrediente funcional más importante: la pasta de nuez. La mayoría de estudios epidemiológicos coinciden en el efecto protector CV de las nueces, independientemente de otros factores como edad, sexo, hipertensión, consumo de tabaco o ejercicio físico; sin embargo, a fecha de hoy el mecanismo que hace que esto sea posible aún está por determinar.

Esta Tesis Doctoral se ha abordado en forma de publicaciones que intentan responder a la pregunta de la conveniencia o no del consumo de un cárnico funcional enriquecido en un 20% de pasta de nuez (WM) por personas con CV elevado. En ella se ha pretendido cubrir unos objetivos que se detallan en esta discusión.

5.1 Composición de la nuez. Importancia de su inclusión en los productos cárnicos. Formulación de cárnicos funcionales.

En el artículo nº 1 publicado en la revista Food Chemistry, 2010, se analizan en forma de revisión bibliográfica aspectos generales y particulares sobre la composición y propiedades nutricionales y cardiovasculares CV debidos al consumo de nueces. Asimismo, en dicho manuscrito se atribuye en parte, la acción protectora CV de las nueces a su particular perfil lipídico, que las hace ricas en AG (62-68% de peso seco), destacando su contenido en AGM (el oleico constituye el 18% del total de AG) y AGP (linoleico y α -linolenico suman respectivamente el 52 y 12% del total de AG). Se destacan a su vez otros componentes minoritarios que se encuentran en las nueces como fibra, proteínas de alto valor biológico (ricas en arginina), vitaminas, minerales, folatos, fitosteroles, polifenoles²⁰⁹.

La elección de las nueces, frente a otros frutos secos, deriva de las recomendaciones de la FAO, que aconseja un consumo diario de 42,5g de nueces, enteras o troceadas, que sin implicar un aumento de peso en los consumidores, debido a su alto contenido calórico, reducen el riesgo de enfermedad coronaria²⁶⁷.

En esta misma revisión se detalla el nacimiento de los alimentos funcionales cuyo origen científico se basa en la búsqueda de una Nutrición Óptima. De esta manera, se

pretende alcanzar un equilibrio fisiológico y limitar el consumo excesivo de nutrientes y/o componentes dietéticos que puedan ser perjudiciales para la salud, así como aumentar la ingesta de aquellos de los que existe evidencia científica de sus efectos beneficiosos. Con el fin de satisfacer estas nuevas necesidades de los consumidores, nacen los alimentos funcionales, entendiendo por alimento funcional, aquel que demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas²⁶⁸. De lo anterior se deduce que los alimentos funcionales ya no son sólo de interés para el consumidor en particular, sino también para toda la sociedad en general, y para ciertos grupos en particular, de ahí el creciente esfuerzo de la industria alimentaria, apoyada por los gobiernos, en el desarrollo de tales alimentos.

Los alimentos funcionales, constituyen por tanto un reto de gran magnitud, ya que no sólo es preciso el desarrollo de éstos por parte de la industria alimentaria, sino que se requieren estudios en humanos que corroboren su potencial beneficioso. Para ello, es necesaria la identificación de biomarcadores, que permitan cuantificar dichos efectos²⁶⁹.

Las nueces por sí solas son capaces de aportar nutrientes beneficiosos para la salud. No obstante, a pesar de que en España se recomienda incrementar su ingesta, en España, el consumo de éstas sigue siendo reducido (2.65 g/día en 2004), aunque mucho más elevado que en otros países, limitándose fundamentalmente a postres o tentempiés²⁶⁷.

En el lado opuesto, está la carne, cuyo consumo ha ido creciendo de forma exponencial, hasta el punto de que en 2008 el consumo per capita se incrementó en un 0,7 % con respecto a 2007 en los países desarrollados y un 1,8 % en países en vías de desarrollo²⁷⁰.

Hasta hace tres décadas, la carne era considerada como un alimento saludable y de gran prestigio, debido a su alto contenido en proteínas de alto valor biológico²⁷¹. También es destacable en la carne el contenido de algunas vitaminas y minerales²⁷², por lo que puede afirmarse que un porcentaje nada despreciable de las ingestas recomendadas para tales micronutrientes es cubierto por el consumo actual de carne en España²⁷³. A partir de la década de los 80, el estudio del impacto de los AG en la salud, y la relación evidente AGS-enfermedad coronaria, relegaría a la carne y derivados cárnicos a un segundo plano, debido a su perfil lipídico, rico en AGS: ácido palmítico y esteárico y en menor proporción mirístico considerado como el AGS más

aterogénico²⁷⁴. El ácido oleico representa casi la mitad de los AG siendo bastante reducido el contenido de AGP.

Tabla 6.- Parámetros nutricionales del cárnico control y del cárnico con un 20% de pasta de nuez. Tomado de Serrano y col.²⁴⁷.

Características	LM	WM
Humedad (g/100g)	74.7	61.1
Proteínas (mg/100g)	20.6	19.5
Grasa (g/100g)	1.6	14.5
Cenizas (g/100g)	3.1	3.2
Calorías (kcal/100g)	99	213
AGP (g/100g)	263,0	10130
ω -6 (mg/100g)	239,5	8013
ω - 3 (mg/100g)	23,40	21,16
Cociente AGP/AGS	0,47	6,67
Cociente AGMI + AGP/AGS	1,37	7,43
Cociente ω -6/ ω -3	10,23	3,79
Índice aterogénico	0,53	0,09
Índice trombogénico	1,22	0,13
Colesterol (mg/100g)	43,60	37,50
α -tocoferol (mg/100g)	0,09	0,20
γ -tocoferol (mg/100g)	0,01	4,07
δ -tocoferol (mg/100g)	nd	0,87
Hierro (mg/100g)	2,08	2,61
Calcio (mg/100g)	7,69	18,82
Magnesio (mg/100g)	20,21	41,38
Manganeso (mg/100g)	<0,07	0,63

LM: cárnico control; WM: cárnico enriquecido en un 20% en pasta de nuez; AGP: ácido graso poliinsaturado; AGS: ácido graso saturado

Teniendo en cuenta tales premisas la industria alimentaria hoy en día entiende como lógica la asociación de un alimento de gran aceptación, la carne, con otro, cuyo consumo es limitado, las nueces, pero que tiene un perfil nutricional óptimo y saludable.

La inclusión de pasta de nuez en los reestructurados cárnicos implicó profundas modificaciones (**Tabla 6**). Es de reseñar el incremento marcado de su contenido energético particularmente debido al aumento de sus lípidos. No obstante, este aumento puede atribuirse casi de forma exclusiva al de los AGM y AGP ω -6 y ω -3. También es reseñable el aumento de γ -tocoferol, que ha sido definido como potente protector cardiovascular²⁷⁵. Además el WM contiene fibra, minerales y compuestos bioactivos de indudable importancia CV^{ccxlvii,276,277}. Respecto al LM destaca su bajo contenido graso manteniendo el alto contenido de proteínas y algunos minerales. (Tabla 6), lo que lo convierte respecto a derivados cárnicos convencionales en un alimento potencialmente funcional y de aplicación particular en regímenes de adelgazamiento.

5.2 Mecanismos antioxidantes relacionados con la enfermedad cardiovascular. Papel y controversias sobre la enzima paraoxonasa (PON1)

La enzima PON1, se detectó por primera vez en 1961 en inmunoprecipitados de HDL⁸⁷. Se la considera un antioxidante clave, sin embargo, la información que se dispone sobre ella es escasa. Nuestro equipo lleva años intentando dilucidar todos los aspectos relativos a su mecanismo de acción, sustrato sobre el que actúa, factores que la influyen, etc.

De hecho, el artículo nº 2 que se presenta en esta Tesis Doctoral, publicado en Medicina Clínica de Barcelona 2003, ha sido un constante referente en nuestras investigaciones y en las de otros investigadores.

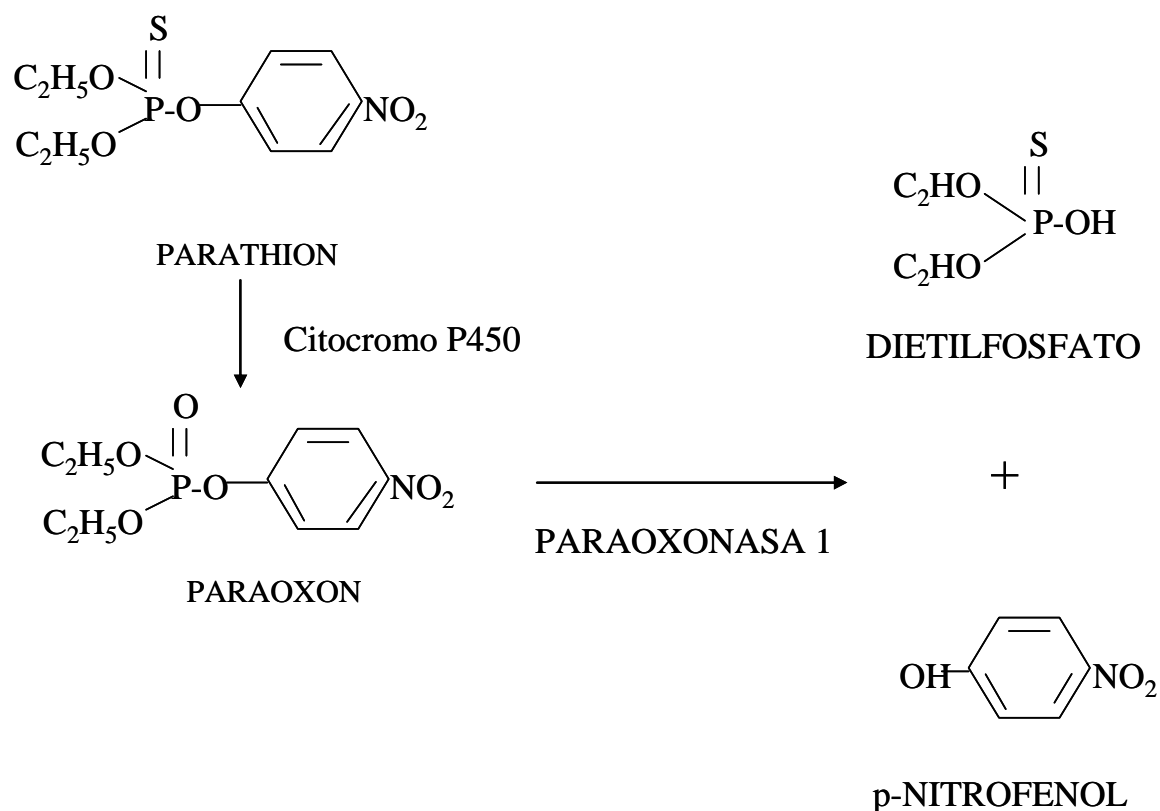


Figura 10.- Hidrólisis del paraoxon por la enzima paraoxonasa 1 (PON1)

La **Figura 10** describe la hidrólisis del paraoxon (metabolito del insecticida paration) por la enzima PON1 (PON1, EC 3.1.8.1. aril-dialquil fosfatasa)⁸³, enzima relacionada con las lipoproteínas HDL, localizada cerca de la Apo AI y la Apo J^{38,278}. La **Figura 11** muestra la unión propuesta en bibliografía de la enzima PON1 a las HDL a través de la Apo A1.

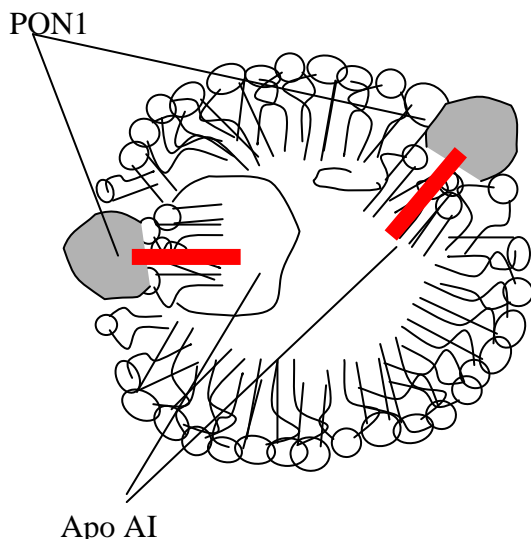


Figura 11.- Posible unión de la enzima PON1 a las HDL a través de un extremo amino terminal (—) en colaboración con la Apo A-I. Modificado de Sorenson y col.²⁷⁹

Por otro lado, se sabe que el gen que codifica esta enzima, de origen principalmente hepático, se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, tal y como viene señalado en la **Figura 12**. Hasta el momento se han detectado 7 polimorfismos en el gen de la PON1 que se muestran en la figura 12^{280, 281}:

a) en la región reguladora: en las posiciones 909, 832, 162, 126, 108, siendo esta última la única que se ha relacionado con mayor riesgo CV en diabéticos portadores de timina en lugar de citosina.

b) en la región codificadora: en las posiciones L55M y Q192R :

b1) el polimorfismo del aminoácido 55, con leucina/metionina (L/M) y

b2) el de la posición 192 que puede llevar arginina/glutamina (R/Q).

En la actualidad existe mucha controversia para relacionar un determinado polimorfismo de la PON1 con el riesgo de CV, pero es probable que en función del polimorfismo presente, su actividad frente a unos u otros sustratos difiera.

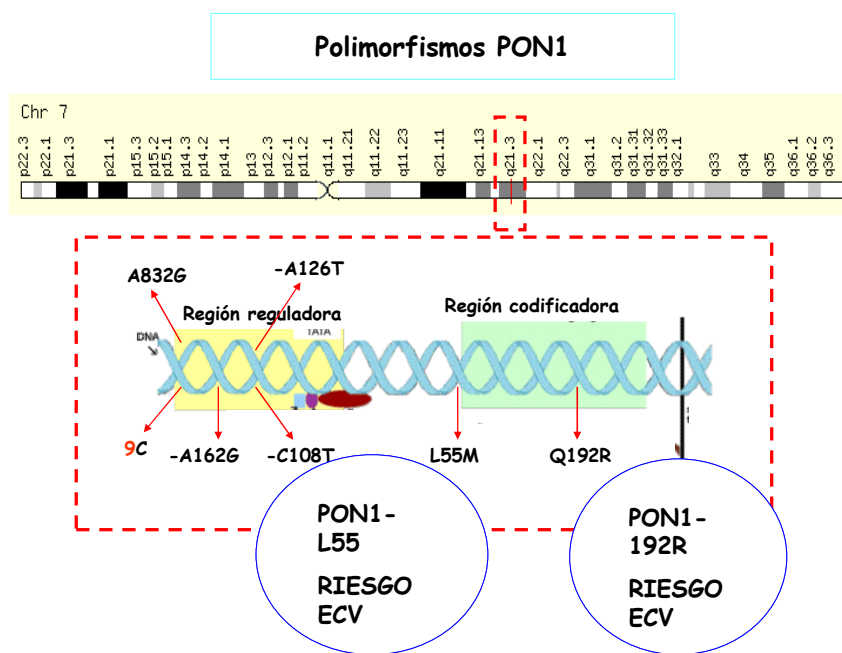


Figura 12.- Polimorfismos PON1. Relación con el riesgo CV.

En dicha revisión se sugiere que el mecanismo de acción antiaterogénico de la enzima PON1 variaba con respecto al mecanismo de detoxificación frente a ésteres aromáticos y compuestos organofosforados. Según Davies y col.¹¹⁴ los individuos con el alelo R son los que hidrolizan más rápidamente el paraoxon. Por otro lado, parece ser que la capacidad de las HDL para defenderse frente a la peroxidación lipídica es superior en los portadores del alelo Q²⁸². En lo relativo a la actividad AE nuestro grupo no ha encontrado diferencias para la actividad AE en función de ningún polimorfismo²⁸². A fecha de hoy, todas estas cuestiones que parecen relacionar tanto la actividad como el genotipo de la PON1 con el riesgo CV, carecen de una respuesta consistente, por lo que los datos encontrados por nuestro grupo son de gran importancia, ya que ayudan a responder en parte a estos aspectos.

5.3 Efecto del consumo de derivados cárnicos enriquecidos con pasta de nuez sobre el estatus antioxidante en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.

En el artículo nº 3, publicado en el Journal of American College of Nutrition (2007) se describen minuciosamente los criterios de riesgo CV, en base a los cuales se analiza

el impacto del consumo del WM sobre marcadores de estrés oxidativo en comparación con el LM.

El estrés oxidativo conlleva alteraciones fisiológicas que propician o aceleran el desarrollo de diversas patologías degenerativas, como por ejemplo la aterosclerosis. Dicho estrés implica el incremento de ERO en el organismo, con la consecuente respuesta de éste, que activa mecanismos de defensa orientados a la eliminación de las ERO. Las referencias bibliográficas, revelan la activación de un sinnúmero de moléculas enzimáticas o no, que participan en reacciones químicas orientadas a combatir los RL y los peróxidos, con el fin de evitar o de revertir el daño celular^{282,283}.

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado el impacto del WM sobre mecanismos de defensa oxidativa: i) convencionales, es decir, aquellos de los que se dispone de abundante información relativa a su impacto en la salud, como son las enzimas: CAT y SOD y el antioxidante no enzimático: el glutatión (GSH y GSSG), ii) no convencionales: la enzima PON1, de reciente descubrimiento y iii) el ácido úrico.

De entre todos los posibles marcadores, se han escogido las actividades CAT y SOD, así como las concentraciones de GSH y GSSG, porque aunque estos marcadores presentan una gran variabilidad, su eficacia en el estrés oxidativo está constada en la bibliografía.

Como se ha comentado en los objetivos, el estudio se realiza manteniendo los hábitos dietéticos de los consumidores, pero controlando el tipo de carne consumida. Esta situación real, permite un mejor seguimiento del tratamiento, ya que cada voluntario actúa como su propio control.

A este respecto debe señalarse que los dos periodos estudiados difirieron significativamente en el contenido y contribución al total del ingreso energético de lípidos, AGS, AGP y vitamina E. Estos cambios se deben fundamentalmente al mayor contenido de grasa de los cárnicos reestructurados conteniendo pasta de nuez, respecto a los cárnicos reestructurados pobres en grasa o control. (Tabla 6).

Aunque no se discute en dicha publicación, debemos señalar que las dietas seguidas en ambos periodos fueron desequilibradas, con un alto contenido en lípidos y proteínas y muy disminuido en hidratos de carbono y fibra dietética respecto a los objetivos nutricionales aceptados actualmente²⁸⁴.

En la actualidad, debido al concepto erróneo de que los hidratos de carbono dietéticos engordan y a la conveniencia de la utilización de dietas cetogénicas para

reducir el peso corporal²⁸⁵ los consumidores tienden a eliminar ciertos componentes de la dieta (p.e. pan), con el consiguiente empobrecimiento de la dieta actual²⁸⁷.

Es muy posible que en el contexto de dietas más equilibradas, el consumo de tales cárnicos resultara en efectos aun más positivos, no obstante, tal como se ha comentado en este estudio se pretendía conocer los efectos del consumo de cárnicos potencialmente funcionales, respetando los hábitos nutricionales de los voluntarios.

En el trabajo publicado en el J Am Coll Nutr se señala que el consumo durante 5 semanas del cárnico WM implicó un aumento significativo en las actividades enzimáticas CAT, SOD y PON1, representadas respectivamente en las **Figuras 13 y 14**, debido entre otros aspectos al aporte por parte de las nueces del cárnico WM de vitamina E (6,04 mg/100g), α (1,90 mg/100g), γ y δ tocoferol (41,4 μ g/100g), ácido fólico (77 μ g/100g) y vitamina C (2,6 μ g/100g)^{198,268}, que contribuyen a mejorar la defensa antioxidante frente a ERO.

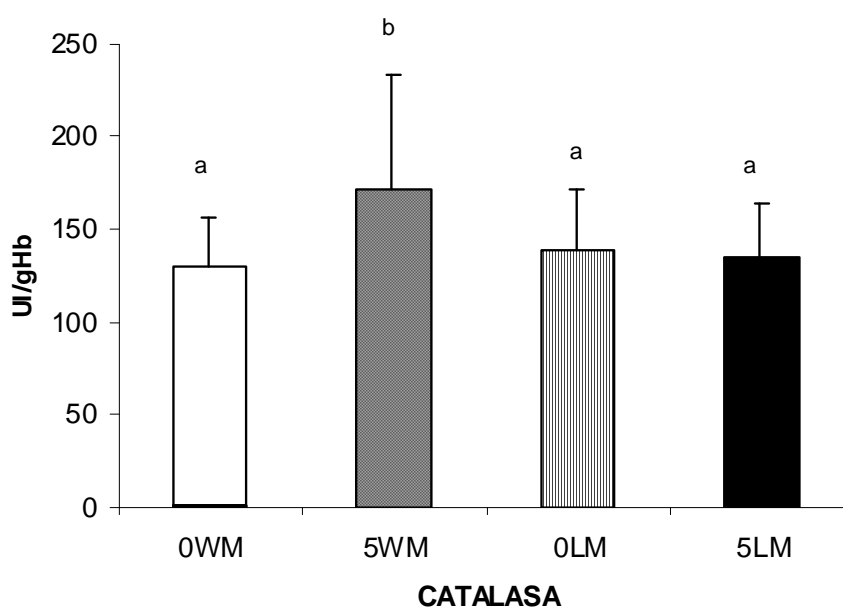


Figura 13.- Actividad catalasa en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM). a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$

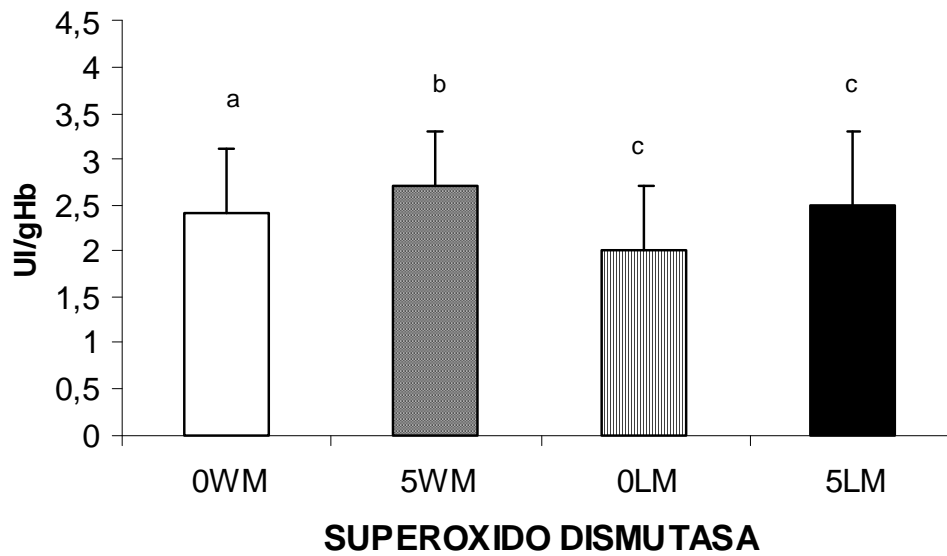


Figura 14.- Actividad superoxido dismutasa (SOD) en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM). a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$

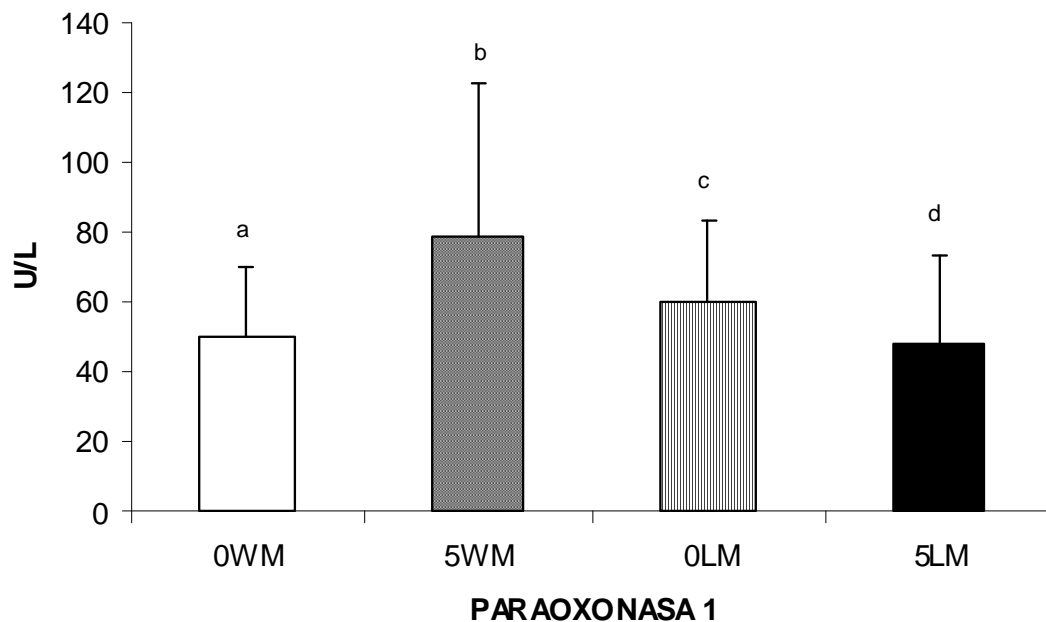


Figura 15.- Actividad paraoxonasa 1 (PON1) en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM).

En cuanto al incremento de la actividad SOD durante el periodo de intervención, podría deberse en parte a que el cárnico WM aporte aproximadamente 29 mg γ -

tocoferol/semana²⁵² habiéndose encontrado en estudios en animales que los suplementos de γ -tocoferol incrementan con mayor efectividad la actividad SOD en comparación con los de α -tocopherol²⁸⁶. Las nueces también contienen polifenoles que contribuyen a mejorar el estatus oxidativo del organismo. Fukuda y col.²⁸⁷ observaron que las elagitaninas, un tipo específico de polifenoles presente en las nueces, son más potentes a la hora de incrementar la actividad SOD que incluso la vitamina C.

La ingesta del WM también incrementó la actividad PON1, y se atribuye dicho efecto a la elevada ingesta de AGP aportada por el cárnico funcional (WN) y los bajos niveles de antioxidantes ingeridos por los voluntarios, ya que parece ser que la PON1 se activa cuando los mecanismos antioxidantes del organismo son insuficientes.

Los conocimientos que se disponen sobre la influencia del ácido úrico en el desarrollo de ECV son un tanto dispares. Existe evidencia científica de que la hiperuricemia constituye riesgo CV^{288, 289} sin embargo, parece necesitarse la confluencia de otros factores adicionales para que se de el desarrollo de patología CV. A pesar de que otros autores han relacionado niveles elevados de ácido úrico con riesgo CV y síndrome metabólico²⁹⁰, nosotros no hemos encontrado que el consumo del WM condujera a cambios significativos en el ácido úrico de los voluntarios.

Por otro lado, en dicha publicación se menciona el IMC, que paradójicamente, no varió debido al consumo del cárnico WM a pesar del alto contenido energético del cárnico con nuez respecto al cárnico control. Este hecho se puede explicar de tres formas diferentes; i) que la energía de las nueces no sea completamente biosiponible²⁹¹ ii) al efecto saciante de las nueces^{292,293}, y iii) a un efecto en el metabolismo energético que compense el incremento de la disponibilidad energética^{294,295}.

Dicho artículo concluye que el cárnico WM es un alimento funcional debido a que durante el periodo de intervención de 5 semanas, actúa favorablemente sobre estos biomarcadores del estatus antioxidante.

5.4 Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre el estatus antioxidante en voluntarios con riesgo cardiovascular portadores de diferentes alelos de la PON1. Interacción dieta-genética

Con el propósito de contestar a este objetivo y ampliar la información disponible y a pesar de contar con una muestra reducida de población, se realizó el genotipado de los voluntarios en relación con la enzima PON1, ya que sus variedades polimórficas podrían ser las máximas responsables del mecanismo de acción de esta enzima. Estos datos se han incluido en el artículo n° 4 que se ha enviado a la revista British Journal of Nutrition.

Al inicio del estudio no se observaron diferencias significativas entre los portadores de los alelos Q o R. La **Figura 16** muestra los resultados de dicha analítica, mediante la que se comprobó que la actividad PON1 era superior en los portadores de glicina en la posición 192 (PON1 192QQ) en comparación con la de los individuos que llevaban glicina/arginina (PON1 192QR+RR), lo que no concuerda con las ideas de otros investigadores, como Davies y col.^{cxiv} que propusieron una actividad PON1 superior en los portadores del alelo R. Por otro lado Akçay y col.²⁹⁶ vieron que los voluntarios con la isoforma R tenían una dificultad superior a la hora de evitar la peroxidación lipídica en las HDL y LDL que aquellos con el alelo Q.

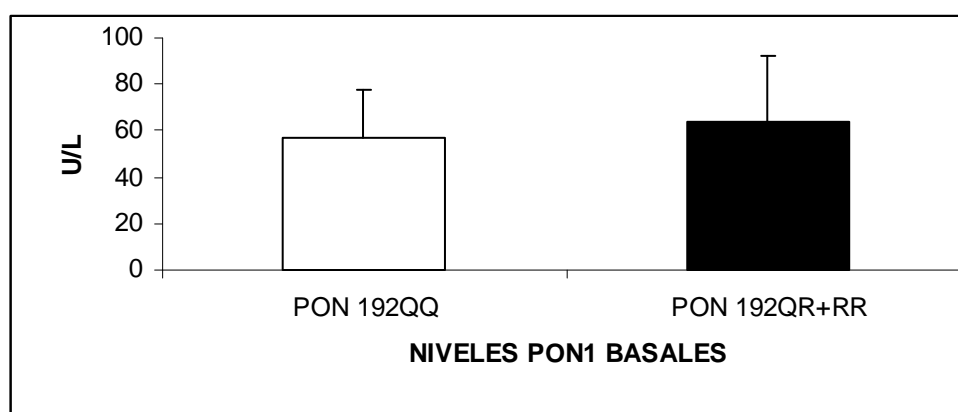


Figura 16.- Actividad PON1 (U/L) al inicio del estudio en los portadores PON1 192QR+RR y en los individuos con el polimorfismo PON1 192QQ

El consumo del cárnico WM en comparación con el cárnico control implica variaciones significativas tanto en el índice redox como en la LPO condicionadas por el polimorfismo de la posición 192 (**Figuras 17 y 18**), lo que sugiere una respuesta opuesta al consumo del cárnico para los individuos con el polimorfismo QQ y con el QR+RR.

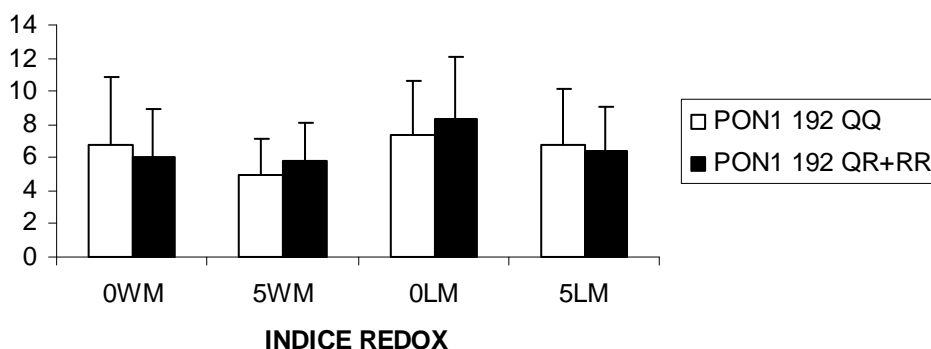


Figura 17.- Índice redox en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo PON1 192QQ y PON1 192QR+RR ($p<0,044$)

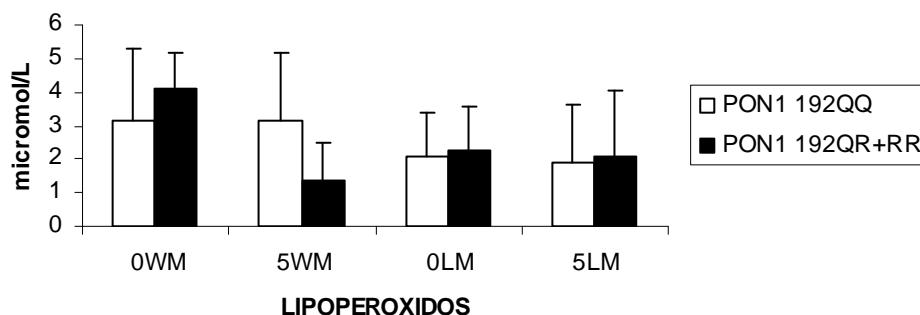


Figura 18.- Concentraciones de LPO en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo PON1 192QQ y PON1 192QR+RR ($p<0,045$)

El consumo de WM condujo a un incremento en las actividades CAT, SOD y PON1, independientemente del polimorfismo. No obstante, las actividades detectadas en las muestras de los individuos con el polimorfismo PON1 192 QQ eran superiores a las de los voluntarios PON1 192 QR+RR. Una posible explicación para esto reside en el incremento del aporte de AGP, por el cárnico WM, que además de actuar sobre los mecanismos antioxidantes, provoca una mayor respuesta en los participantes con el

polimorfismo QQ que en los que mostraban el QR+RR. Por lo tanto, al igual que Sözmen et al.²⁹⁷, en la figura 19 se observa el efecto del consumo de WM frente al consumo de LM sobre los niveles de GSSG ($p<0,012$), para el polimorfismo de la posición 192 de la PON1, donde se ve un mayor incremento de GSSG en los portadores de la variante QQ. Al igual que Sözmen y col.²⁹⁷ nosotros tampoco podemos descartar que estas tres enzimas actúen sinérgicamente para evitar o frenar la peroxidación lipídica, fundamentalmente ante un exceso de AGP debidos al cárnico WM, que hace que en organismo se potencien todos los sistemas posibles con el objetivo de mantener un índice redox (GSH/GSSG) bajo.

Al analizar el polimorfismo de la posición 55, se vio que la actividad PON1 disminuyó en el periodo control y aumentó en el periodo de intervención para los dos polimorfismos de esta posición. Nuestro estudio reveló que la ingesta del cárnico WM provocó mayores cambios en los individuos portadores del alelo M. Las **Figuras 19 y 20** muestran los niveles de GSH y GSSG para el polimorfismo de la PON1 de la posición 55 respectivamente.

Estos datos muestran una idea de la influencia de los polimorfismos de la PON1, sin embargo, se requieren nuevos estudios para poder corroborar los resultados obtenidos.

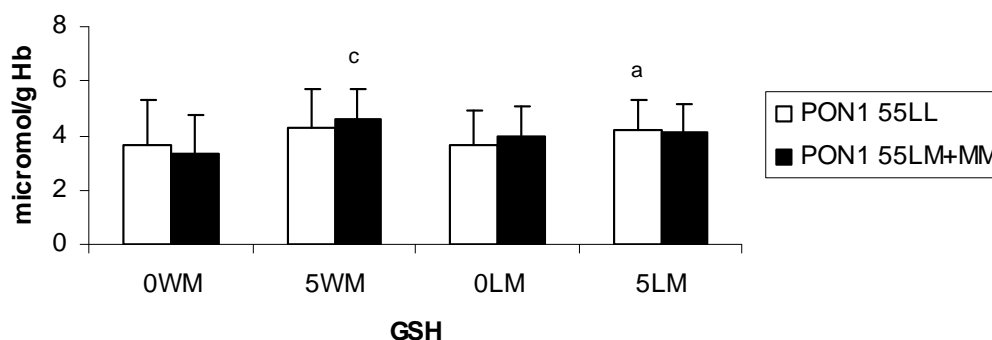


Figura 19.- Niveles de GSH en las semanas 0 y 5 en función del efecto del consumo de WM en comparación con el de LM para el polimorfismo de la posición 55 de la PON1 ($p<0,049$)

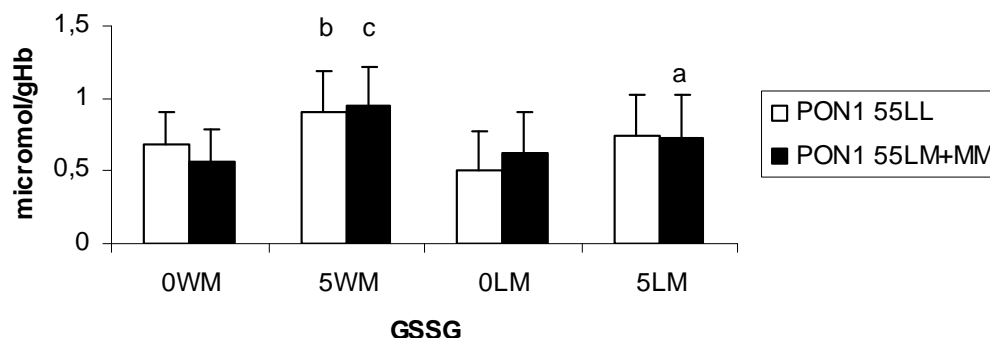


Figura 20.- Niveles de GSSG en las semanas 0 y 5 en función del efecto del consumo de WM en comparación con el de LM para el polimorfismo de la posición 55 de la PON1 ($p < 0,047$)

5.5 Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre la agregación plaquetaria y trombogénesis en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.

Este objetivo se ha planteado en el artículo n° 5 de esta Tesis publicado en British Journal of Nutrition (2009). La agregación plaquetaria y la producción y niveles de tromboxano A_2 (medido como TXB_2), de prostaciclina I_2 (medida como 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$) y la proporción $TXB_2/6\text{-ceto-}PGF_{1\alpha}$, son parámetros susceptibles de ser modificados por la dieta. En el Trabajo 5 se exponen los cambios inducidos por la ingesta de los cárnicos, corroborando así, la potencial funcionalidad del cárnico WM. Se determinaron en la primera semana, la tercera y la quinta de cada periodo de estudio.

Como ya se ha comentado, la dieta del cárnico WM proporcionaba altos niveles de AGP y presentaba una proporción $\omega\text{-6}/\omega\text{-3}$ más favorable que el cárnico control, lo que puede constituir el motivo por el que en la semana 5, el cárnico WM modificó significativamente los valores de agregación plaquetaria en comparación con la misma semana del periodo control. Los niveles de TXA_2 y PGI_2 también sufrieron modificaciones debidas a la dieta, lo que es comprensible dada su intrínseca relación con la agregación plaquetaria. En el organismo ha de darse una relación $TXB_2/6\text{-ceto-}PGF_{1\alpha}$ equilibrada para que no aparezcan fenómenos trombóticos.

Entre las posibles moléculas implicadas para que el consumo del cárnico WM induzca una menor agregación plaquetaria, además de su componente lipídico, se encuentran otras sustancias que aparecen en los alimentos naturales, que son los flavonoides. Estos poseen propiedades antiinflamatorias y vasodilatadoras, inhiben la peroxidación lipídica, la agregación plaquetaria y la permeabilidad capilar, y a su vez influyen sobre la FLasa A₂, la COX y la LO, modificando por tanto, la producción de eicosanoides y la agregación plaquetaria. Se ha llegado a sugerir incluso, que el tocoferol, presente en nueces, puede por sí mismo disminuir la trombogénesis. De hecho, Saldeen y col.²⁹⁸ observaron que la suplementación con γ -tocoferol era más potente que la de α -tocoferol a la hora de disminuir la agregación plaquetaria. Los dos tocoferoles pueden implicar un aumento de los niveles de NO y un aumento de la actividad de la NO sintasa endotelial, sin embargo, sólo el γ -tocoferol condujo a un aumento en la expresión proteica de esta enzima²⁸⁸.

Relou y col.²⁹⁹ sugirieron que las lipoproteínas circulantes pueden afectar al fenotipo de las plaquetas, por medio de uniones a la plaqueta a través de receptores específicos (CD36, SR-B1 y LOX-1), incidiendo sobre su composición y función. No obstante, el mecanismo por el que esto sucede está pendiente de ser esclarecido. Parece no consistir en una simple unión de las LDL a la superficie plaquetaria, o internalización en la plaqueta por endocitosis, sino en una activación de las señales de transducción o un intercambio lipídico. De esta manera, las partículas LDL nativas pueden inducir la síntesis o la translocación de los FL de la membrana de la plaqueta o facilitar la incorporación de FL presentes en el torrente sanguíneo³⁰⁰. Sí las LDL reconocidas por los receptores de las plaquetas están oxidadas se induce la activación y la agregación plaquetaria, favoreciéndose la formación del trombo, sobre todo tras la ruptura de la placa de ateroma³⁰¹.

En este artículo también se recuerda que la obesidad es un factor de riesgo trombogénico, relacionada directamente con unos niveles superiores de agregación plaquetaria. El cárnico funcional WM, no condujo a cambios significativos en el IMC, sin embargo, como se puede observar de la **Figura 21** redujo los niveles de TXA₂ de forma más marcada en los individuos más obesos, sugiriendo, por tanto, que estos sujetos pueden ser los auténticos candidatos para la terapéutica CV basada en el consumo de estos cárnicos funcionales. En contrapartida, los niveles de prostaciclina se

elevaron debido al consumo del cárnico funcional WM, en todos los voluntarios, probablemente debido al elevado aporte de ácido linolénico por las nueces.

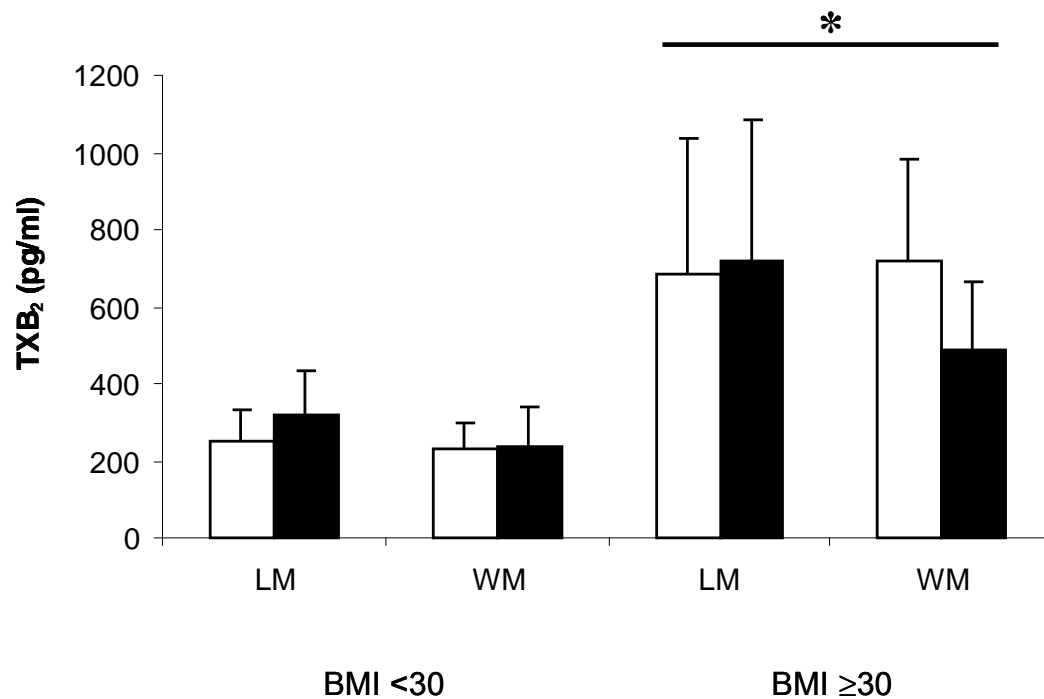


Figura 21.- Variación en los niveles de TXB₂ a lo largo del estudio en función de IMC

No obstante, no se conocen con exactitud los mecanismos a través de los cuáles el cárnico funcional WM disminuye los niveles de TXA₂ y aumenta los de PGI₂. Chan y col.³⁰² encontraron que la producción de TXB₂ disminuyó significativamente cuando se substituyó una mezcla de aceite con una alta relación linoleico/linolénico por otra mezcla de aceites donde tal relación estaba disminuida, por lo que puede sugerirse que el cociente linoleico/linolénico más balanceado del WM (Trabajo n° 1) puede estar implicado ya que disminuiría el contenido de EPA en los FL de membrana de voluntarios durante el periodo WM conduciendo a una menor producción de TXA₂. La **Figura 22** muestra la relación TXA₂/PGI₂ con el IMC.

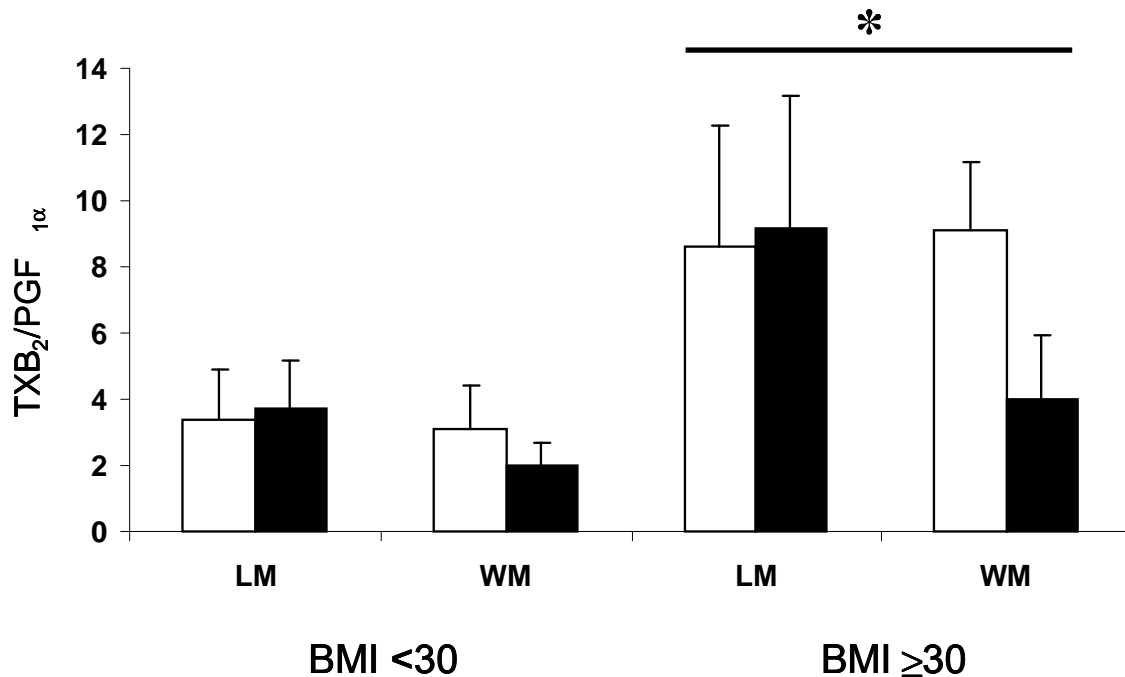


Figura 22.- La relación TXA₂/PGI₂ con el IMC en función de la semana y del periodo de intervención (WM) o control (LM).

5.6 Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre la agregación plaquetaria y trombogénesis en voluntarios con riesgo cardiovascular portadores de diferentes alelos de la APO A4. Interacción dieta-genética

Con la finalidad de esclarecer, al menos parcialmente, los mecanismos a través de los cuáles el cárnico funcional WM disminuye los niveles de TXA₂ y aumenta los de PGI₂ se discute en el artículo n° 6 publicado en Nutrición Hospitalaria (2010) la posible influencia del polimorfismo del gen de la APOA4 en el desarrollo de la trombogénesis.

La APOA4 es una molécula que ejerce diversas funciones fisiológicas, como la absorción intestinal de colesterol y el metabolismo de los quilomicrones. Ésta, al igual que la enzima PON1, muestra polimorfismo genético que condiciona sus propiedades biológicas. En este estudio se analizaron las variantes de la APOA4 a nivel del gen 360, APOA4-1, que se correspondían con los individuos homocigotos para el alelo de histidina y los APOA4-2 que portaban el alelo glicina.

Hasta la fecha de la publicación, ningún grupo investigador había evaluado la posible relación trombogénesis-APOA4, por lo que puede afirmarse que los resultados obtenidos dibujan una nueva perspectiva a la hora de abordar los factores de riesgo trombogénicos.

Existen referencias bibliográficas que describen la influencia positiva de la variante APOA4-2 en el metabolismo lipídico. Según los resultados obtenidos por nuestro equipo el consumo del cárnico funcional WM afecta de forma diferente en función del tipo de polimorfismo de la APOA4. De hecho, la producción de TXB₂ (**Figura 23**) para los individuos APOA4-2 disminuyó más que para los APOA4-1, mientras que para la PGI₂ ocurrió lo contrario (**Figura 24**). No hemos encontrado una hipótesis neta para explicar este hecho. No parece estar relacionado con la dieta, sino que puede deberse intrínsecamente al efecto del polimorfismo de la APOA4. No obstante, se requieren más estudios para comprobar esto.

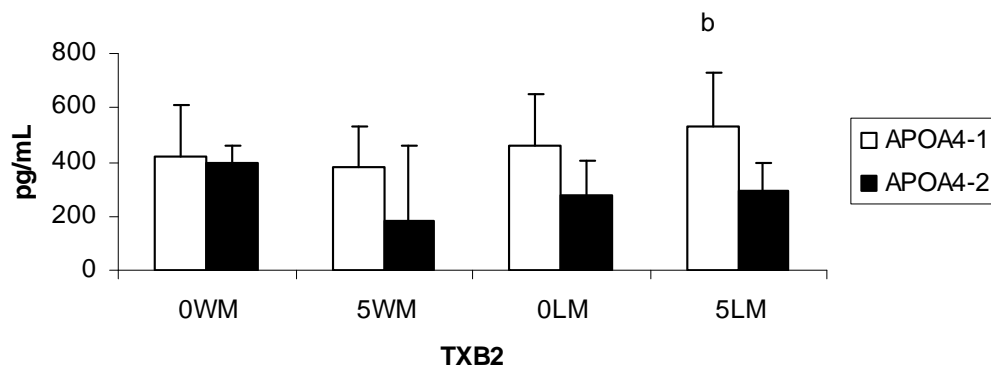


Figura 23.- Concentraciones de TXB₂ en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo APOA4-1 y APOA4-12 (b;p<0,05)

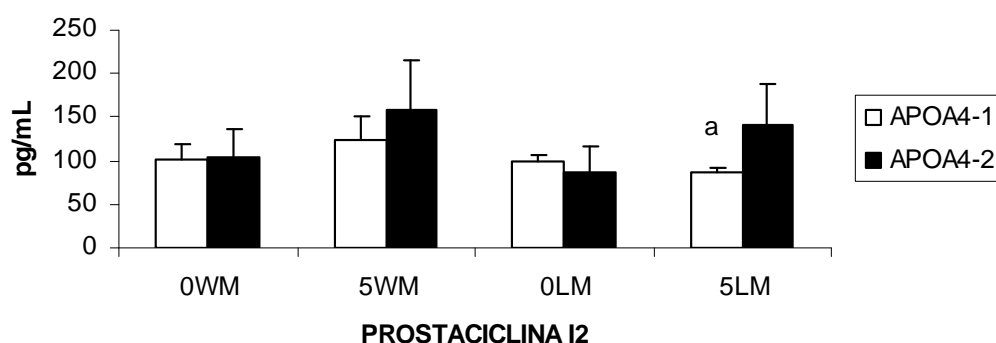


Figura 24.- Figura concentraciones de $\text{PGF}_{1\alpha}$ en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo APOA4-1 y APOA4-12 (a:p<0,05)

Los responsables de esta mejora en el perfil trombogénico pueden ser algunos componentes minoritarios de las nueces, junto con la relación ω -6/ ω -3, pero de forma más precisa con la relación linoleico/linolénico³⁰². Entre ellos el tocoferol y los flavonoides, podrían ser los antioxidantes fenólicos capaces de inhibir la síntesis de eicosanoides y por tanto disminuir la agregación plaquetaria^{ccxcix,303} y adicionalmente reducir los niveles de peróxidos lipídicos³⁰⁴. Aun con todo, un estudio reciente³⁰³ ha mostrado que ciertos flavonoides son capaces de aumentar la síntesis de eicosanoides en lugar de inhibirla, por ello, se requieren estudios que relacione la APOA4 y la absorción de estos componentes minoritarios.

5.7 Efecto del consumo de derivados cárnicos conteniendo pasta de nuez sobre la producción leucotrienos y moléculas de adhesión en voluntarios con riesgo cardiovascular incrementado.

La aterosclerosis es un proceso complejo, en el que el daño inflamatorio juega un papel importante tanto en el inicio como en la progresión de esta enfermedad⁹. Por ello, es necesario analizar si la ingesta del cárnico funcional WM proporciona o induce algún efecto antiinflamatorio. Entre los múltiples marcadores de inflamación que se encuentran en el organismo están las citoquinas, moléculas liberadas por los monocitos,

macrófagos y neutrófilos, que inducen la expresión de moléculas de adhesión como la VCAM-1 y la ICAM-1³⁰⁵. Estas últimas forman parte de un grupo de inmunoglobulinas y son consideradas marcadores de riesgo CV¹²².

En, el artículo n° 7 de esta Tesis Doctoral se han cuantificado los niveles de estas moléculas de adhesión en la semana cero, la tercera y la quinta de cada periodo de intervención.

El consumo del cárnico WM, al igual que el LM condujo a una reducción en los niveles de VCAM-1 y de ICAM-1 a las 5 semanas. El efecto sobre los niveles de dichas moléculas de adhesión resultó variable en función de los genotipos de PON1, así como de APO A4.

Al analizar el polimorfismo de la posición 192, se vio que los niveles de ICAM-1 disminuyeron para todos los casos, siendo significativa dicha reducción para los individuos homocigotos para la glutamina (**Figura 25**). A diferencia que lo ocurrido para la ICAM-1, los niveles de VCAM-1 se redujeron a las 5 semanas en todos los casos, a excepción de la ingesta LM en los individuos portadores del genotipo PON1 192 RR+QR, que implicaron un aumento (Figura 25).

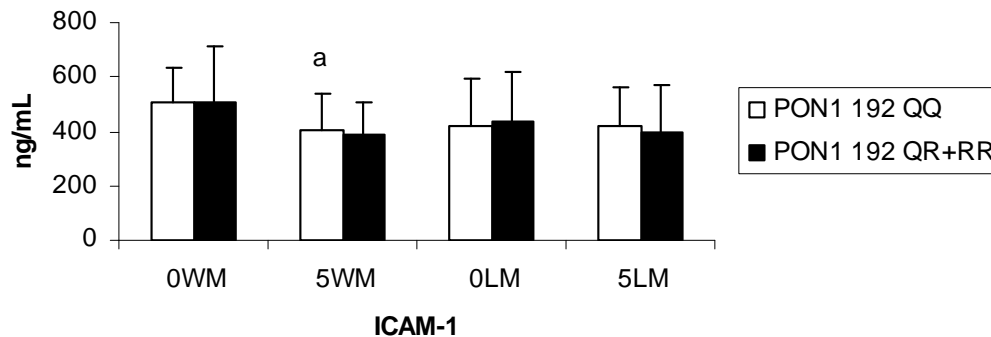


Figura 25.- Figura concentraciones de ICAM-1 en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo PON1 192 QQ y PON1 192 QR+RR; a: $p < 0,05$

En relación al polimorfismo de la posición 55, la ingesta del WM resultó más efectiva a la hora de disminuir los niveles de la ICAM-1, para los individuos que portaban metionina (**Figura 26**), aunque de forma global se puede decir que el WM condujo a una disminución de la ICAM-1 y de la VCAM-1 en la semana 5.

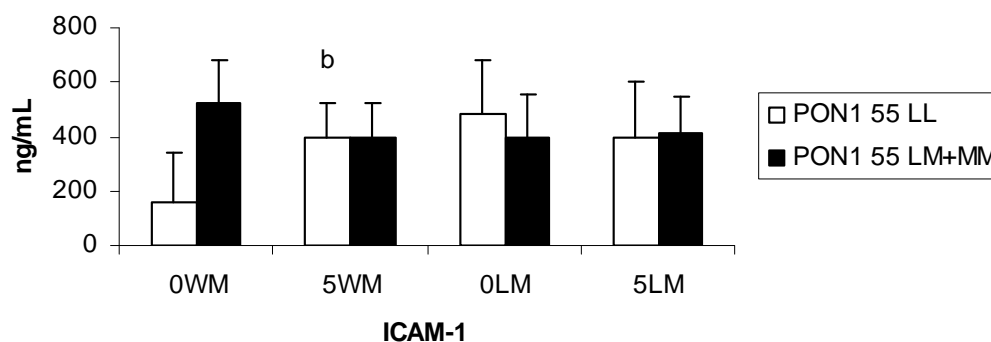


Figura 26.- Concentraciones de ICAM-1 en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo PON1 192 LL y PON1 192 LM+MM; b: $p < 0,01$

La clasificación de los voluntarios en base a la APO A4, permitió observar que la inclusión del WM durante 5 semanas en la dieta de los voluntarios implicó una disminución más significativa para los individuos portadores del APO A4-2. (**Figura 27)**

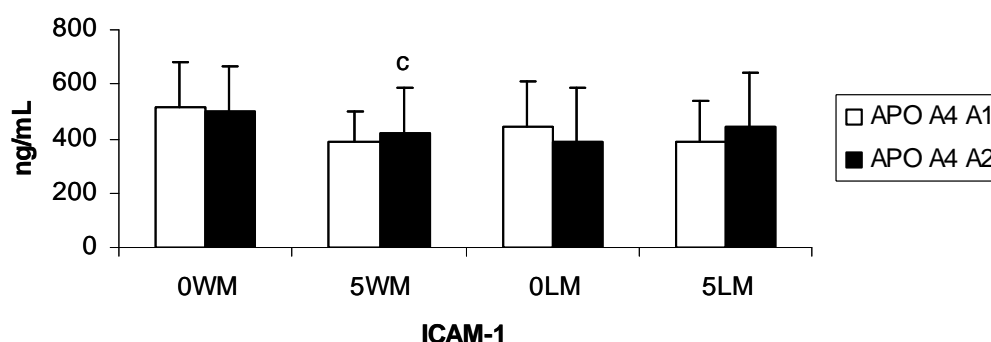


Figura 27.- Concentraciones de ICAM-1 en las semanas 0 y 5 de los periodos de cárnico con nuez (WM) y cárnico control (LM) en los individuos con el genotipo APO A4 A1 y APO A4 A2; b: $c < 0,001$

La expresión de estas moléculas se acentúa en función del estadio de inflamación del endotelio, es decir, cuanto más inflamado esté, más presencia de VCAM-1 e ICAM-1³⁰⁶, por lo que es lógico que individuos con varios factores de riesgo CV, presentaran mayores niveles de inflamación y por tanto más moléculas de adhesión. De hecho otros autores han subrayado que los niveles de ICAM-1 son superiores en pacientes con enfermedad coronaria³⁰⁷ y que los niveles sanguíneos de ICAM-1 pueden considerarse predictores de infarto de miocardio en sujetos sanos³⁰⁸, mientras que la VCAM-1

aparece elevada en lesiones y placas ateroscleróticas avanzadas³⁰⁹. Los elevados niveles de peroxidación (medidos como LPO) encontrados en los voluntarios conducen a la activación de factores de transcripción que controlan la expresión de las moléculas de adhesión mediada por el peróxido de hidrógeno³¹⁰, por lo que no es de extrañar que los altos niveles de moléculas de adhesión, sean susceptibles de ser disminuidos por los antioxidantes y otros componentes de la carne con nueces. Los mecanismos exactos mediante los cuales el cárnico WM redujo los niveles de VCAM-1 e ICAM-1, se desconocen, sin embargo, durante los últimos años, diversos investigadores han propuesto la dieta como factor clave regulador de la expresión las moléculas de adhesión. Se ha sugerido que los AGP n-3 pueden inhibir la inflamación y la activación endotelial al disminuir los peróxidos de hidrógeno interactuando con las ERO³¹¹. Estos mismos autores encontraron que el DHA reduce la expresión de la VCAM-1 y la ICAM-1 en cultivos de células endoteliales humanas³¹². Al igual que Rallidis y col.³¹³ que vieron una disminución en los niveles de VCAM-1 en pacientes con dislipidemia al ingerir una dieta rica en ácido α -linolenico, nuestros resultados indican que el consumo de nueces por individuos hipercolesterolémico reduce los niveles de VCAM-1. Por lo tanto la asociación dieta, y en particular los AG de la dieta, y moléculas de adhesión parece indisociable. Nuestras investigaciones revelan que otros factores como sexo, IMC o tabaco también podrían afectar a los niveles de VCAM-1 e ICAM-1; no obstante, dado que la población de estudio era relativamente pequeña, pensamos se requieren otros ensayos para verificar dichos datos.

6 RESUMEN Y CONCLUSIONES

En esta memoria de Tesis Doctoral se ha procedido a estudiar en pacientes con riesgo cardiovascular (CV) incrementado los efectos de un cárnico funcional enriquecido en pasta de nuez al 20% en comparación con los de un cárnico control con bajo contenido en grasa. La estimación del riesgo CV se evaluó según las indicaciones ATP III³¹⁴. La carne constituye una matriz idónea para la inclusión de nueces. El cárnico resultante es un alimento con un perfil nutricional más balanceado que la carne original, además de constar con unas características sensoriales correctas.

Los 22 voluntarios reclutados de un total de 144 que se presentaron al estudio fueron consumidores habituales de carne (> de 5 veces/semana), hombres mayores de 45 años y/o mujeres mayores de 50 años posmenopáusicas, con sobrepeso (índice de masa corporal (IMC) ≥ 25 kg/m²) u obesidad tipo I (IMC ≥ 35 kg/m²). Además debían tener niveles de colesterol sérico total elevados ($\geq 5,69$ mmol/L), ser hipertensos (tensión sistólica ≥ 140 mm Hg y/o tensión diastólica ≥ 90 mm Hg) y/o fumadores habituales (≥ 10 cigarrillos / día) y no tomar medicación que afectara la colesterolemia o la presión arterial.

El estudio fue cruzado, controlado con placebo y constó de dos periodos experimentales separados por un periodo de lavado. En uno de ellos los voluntarios ingirieron el cárnico con nuez y en el otro el cárnico control con bajo contenido graso.

Con el fin de conocer el impacto del cárnico funcional se estudiaron: a) los cambios en la agregación plaquetaria, b) la producción de eicosanoides (TXA₂, PGF_{1 α} , LTB₄), c) la producción de moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1) c) el estatus antioxidante cuantificando las actividades enzimáticas CAT, SOD, y PON1, así como el antioxidante no enzimático glutatión reducido y oxidado y la relación GSH/GSSG y d) la influencia de polimorfismos en el gen de la enzima PON1 y de la APO A4 en la respuesta al consumo del cárnico con nueces o con bajo contenido en grasa. También se analizaron las modificaciones en otros marcadores más comunes como el colesterol sérico, el ácido úrico, así como posibles cambios en las medidas antropométricas y la tensión arterial.

Los resultados obtenidos permiten concluir:

1. El consumo de cárnico enriquecido en pasta de nuez respecto al cárnico control con bajo contenido graso, elevó la ingesta energética, pero mejoró el perfil nutricional

de las dietas de los voluntarios al aportar más hidratos de carbono, fibra, vitamina E, ácidos grasos poliinsaturados, y menos ácidos grasos saturados.

2. La ingesta de carne con nuez respecto al cárnico control no afectó al peso corporal ni al índice de masa corporal

3. El consumo del cárnico con nuez disminuyó significativamente la agregación plaquetaria, y aumentó el tiempo requerido para que ésta llegara a ser máxima.

4. La concentración del factor trombogénico y vasoconstrictor TXA_2 , disminuyó durante el periodo de carne con pasta de nuez respecto al del cárnico control, mientras que los niveles del antiagregante plaquetario PGI_2 , aumentaron. El cociente trombogénico se redujo significativamente durante el periodo del cárnico con nuez respecto al del cárnico control.

5. Los polimorfismos del gen de la Apo A4 afectaron al riesgo cardiovascular. El cárnico con nuez disminuyó en mayor cuantía la agregación plaquetaria, en los portadores de la variante alélica APOA4-1.

6. Los niveles de TXA_2 y la relación $\text{TXB}_2/\text{PGI}_2$ disminuyeron más por la intervención nutricional en los individuos APOA4-2. Para estos mismos individuos se encontró un incremento superior en la PGI_2 .

7. Las actividades de las enzimas antioxidantes catalasa, superóxido dismutasa y paraoxonasa 1 se incrementaron a las 5 semanas de consumo del cárnico con nueces.

8. La actividad de estas enzimas está condicionada por los polimorfismos en posición 192 y en posición 55 del gen de la enzima PON1.

9. Respecto al polimorfismo en posición 192 del gen de la paraoxonasa 1, el incremento de la actividad catalasa y superóxido dismutasa a las 5 semanas de ingerir el cárnico con nueces fue superior para los homocigotos QQ, que para los portadores QR+RR, los cuales alcanzaron los niveles de actividad paraoxonasa 1 más elevados en todo el estudio.

10. Los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado en la semana 5 del periodo cárnico con nueces se incrementaron más para los individuos PON1 192QQ que para los PON1 192QR+RR. El índice redox disminuyó de forma más marcada en los PON1 192QQ.

11. El cárnico con nueces, por el contrario, condujo a un descenso más acusado de lipoperóxidos en los individuos PON1 192QR+RR.

12. En relación al polimorfismo del gen de la paraoxonasa 1 en la posición 55, la ingesta del cárnico con nuez implicó incrementos de glutathione reducido y glutathione peroxidado en los portadores PON1 55LM+MM frente a los PON1 55LL.

13. Los niveles de VCAM-1 y de ICAM-1 se redujeron debido al consumo del cárnico con nuez. Mientras que los niveles de VCAM-1 se vieron afectados por la variante APO A4-2, los de ICAM-1 estuvieron condicionados por los polimorfismos en las posiciones 55 y 192 de la paraoxonasa-1.

14. Los niveles de leucotrienos B₄ disminuyeron debido al cárnico con nuez y aumentaron con el cárnico control. Las variantes genéticas no implicaron variaciones significativas.

6.1 Conclusión general e implicaciones

El cárnico enriquecido con nueces, no sólo tiene un mejor perfil nutricional, sino que presenta efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular ya que produce i) una disminución en biomarcadores de riesgo cardiovascular, ii) mejora del estatus antioxidante y iii) reducción de la agregación plaquetaria y los marcadores trombogénicos. Por otro lado, también se ha constatado una posible influencia genética que explica parcialmente la variabilidad de los resultados, siendo los portadores de las variantes génicas APO A4-2 y PON1 192 QQ y PON1 55 LM+MM los que responden de manera más satisfactoria al tratamiento con la carne enriquecida en pasta de nuez. No obstante, dado que la población de estudio es relativamente pequeña, creemos se requieren futuros estudios que avalen los resultados obtenidos.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Comunidad Europea. Salud Pública. Ficha informativa sobre enfermedades crónicas: enfermedades cardiovasculares.
http://ec.europa.eu/health/ph_information/dissemination/diseases/cardiovascular_es.htm
- ² Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Allander S, Scarborough P, Peto V y Rayner M. European cardiovascular disease statistics. 2008 Edition. Bruselas, Bélgica.
- ³ Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según causa de muerte. 2004.
www.ine.es. Cardiovascular disease statistics. 2008 Edition.
- ⁴ Mortalidad por cáncer, por enfermedad isquémica del corazón, por enfermedades cerebrovasculares y por diabetes mellitas en España. Instituto de Información Sanitaria. Agencia de Calidad del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo.
www.msc.es
- ⁵ Slijkhuis W, Mali W y Appelman Y. A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis. *Neth Heart J*. 2009;17:140-114
- ⁶ Boon B. Leonardo da Vinci on atherosclerosis and the function of the sinuses of Valsalva. *Neth Heart J*. 2009;17(12):496-499
- ⁷ Goldstein JL y Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem*. 1977;46:897-930.
- ⁸ Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Eng J Med*. 1999;340:115-126.
- ⁹ Steinberg D, Parthasarathy S y Carew TE. Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N Eng J Med*. 1989;320:915-924.
- ¹⁰ Consigny PM. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Roentgenol*. 1995;164:553-558.
- ¹¹ Hiltunen TP, Luoma JS, Nikkari T y Yla-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation*. 1998;97:1079-1086.
- ¹² Stopeck A, Nicholson A y Hajar D. Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HEP 62 cells. *J Biol Chem*. 1993;268:17489-17494.
- ¹³ Born GV. New determinants of the uptake of atherogenic plasma proteins by arteries. *Basic Res Cardiol*. 1994;89:103-106.
- ¹⁴ Fong LG, Parthasarathy S, Witztum JL y Steinberg D. Nonenzymatic oxidative cleavage of peptide bonds in apoprotein B-100. *J Lipid Res*. 1987;28:1466-1477.

-
- ¹⁵ Frei B, Stocker R y Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci*. 1988;85:9748-9752.
- ¹⁶ Stocker R y Keany Jr JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-1478.
- ¹⁷ Garrido-Polonio C, García-Linares MC, García-Arias MT, López-Varela S, García-Fernández MC, Terpstra AH y Sánchez-Muniz FJ. Thermally oxidised sunflower-seed oil increases liver and serum peroxidation and modifies lipoprotein composition in rats. *Brit J Nutr*. 2004;92:257-265.
- ¹⁸ Alonso R. Vitaminas antioxidantes. Controversias actuales. En: *Metabolismo lipídico. Sociedad y Colesterol*. De Oya M y Garcés C. Eds. IDEPSA, Madrid, 1997; pp. 201-210.
- ¹⁹ Sánchez-Muniz FJ y Sánchez-Montero JM. Enzymatic methods for the study of thermally oxidized oils and fats. En: *Frying of Food. Oxidation, Nutrient and Non-Nutrient antioxidants, Biologically Active Compounds and High Temperatures*. Boskou D, Elmadfa I. Eds. Technomic Publishing Co. Lancaster, USA, 1999; pp. 105-142.
- ²⁰ Korpihlati K, Engblom E, Syvanne M, Hamalainen H, Puukka P, Vanttinen E y Ronnema T. Angiographic changes in sapheneus vein grafos and atherosclerosis risk factors. A 5-year study with serial measurements of serum lipids and lipoproteins. *Scand Cardiovasc J*. 1998;32:343-351.
- ²¹ Doi H, Kugiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumura T, Ohta Y, Nakano T, Nakajima T y Yasue H. Remnants of chylomicron and very low density lipoprotein impair endothelium-dependent vasorelaxation. *Atherosclerosis*. 1998;137:341-349.
- ²² Greaves DR y Gordon S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res*. 2005;46:11-20.
- ²³ Navab M, Hama SY, Reddy ST, Ng CJ, Van Lenten BJ, Laks H, Fogelman AM y Ready ST. Oxidized lipids as mediators of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 2002;13:363-372.
- ²⁴ Hayden JM, Brachova L, Higgins K, Obermiller L, Sevanian A, Khandrika S y Reaven PD. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-cetocholesterol. *J Lipid Res*. 2002;43:26-35.
- ²⁵ Rosklint MT, Ohlsson BG, Wiklund O, Noren K y Hulten L. Oxysterols induce interleukin-1 β production in human macrophages. *J Clin Invest*. 2002;32:35-42.

- ²⁶ Asztalos BF, Collins D, Cupples LA, Demissie S, Horvath KV, Bloomfield HE, Robins SJ y Schaefer EJ. Value of high-density lipoprotein (HDL) subpopulations in predicting recurrent cardiovascular events in the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2013-2015.
- ²⁷ Asztalos BF, Roheim PS, Milani RL, Lefevre M, McNamara JR, Horvath KV y Schaefer EJ. Distribution of apo A-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2670-2676.
- ²⁸ Watson AD, Leitinger N, Navab M, Faull KF, Horkko S, Witztum JL, Palinsky W, Schwenke D, Salomon RG, Sha W, Subbanagounder G, Fogelman AM, Berliner JA. Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272:13597-13607.
- ²⁹ Alpers DH, Lock DR, Lancaster N, Poksay K y Schonfeld G. Distribution of apolipoproteins A-I and B among intestinal lipoproteins. *J Lip Res.* 1985;26:1-10.
- ³⁰ Sánchez de Medina F. HDL molecular pathology. *Ars Pharmac.* 2000;41:59-65.
- ³¹ Gillard BK, Courtney HS, Massey JB, Pownall HJ. Serum opacity factor unmasks human plasma high-density lipoprotein instability via selective delipidation and apolipoprotein A-I desorption. *Biochemistry.* 2007;46:12968-12978.
- ³² Nus M. Determinación de la actividad arilesterasa e implicaciones y relaciones con el metabolismo lipoproteico y riesgo cardiovascular. Tesis Doctoral, UCM, Madrid, 2007.
- ³³ Nichols AV, Gong EL y Blanche PL. Interconversion of high density lipoproteins during incubation of human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;100:391-399.
- ³⁴ Michael D. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), NCBI; Nov, 2002. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mono_001 (acceso Abril, 2009).
- ³⁵ Sánchez-Muniz, F.J. Curso de Doctorado “Nutrición y Enfermedades Cardiovasculares”. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2009.
- ³⁶ Miller GJ y Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet.* 1975;1:16-19.

- ³⁷ Van Tol A. Reverse cholesterol transport. En: Cholesterol transport systems and their relation to atherosclerosis. Steinmetz J, Kaffarnik H y Schneider J. Eds. Springer-Verlog, Berlin/Heidelberg, 1989; pp. 85-88.
- ³⁸ Kekki M. Lipoprotein-lipase action determining plasma high density lipoprotein cholesterol level in adult normolipaemics. *Atherosclerosis*. 1980;37:143-150.
- ³⁹ Schmitz G, Niemann R, Brenhausen B, Krause R y Assman G. Regulation of high density lipoprotein receptors uncultured macrophages, role of acyl CoA: cholesterol acyltransferase. *EMBO J*. 1985;11:2773-2779.
- ⁴⁰ Tabas J y Tall AR. Mechanism of the association of HDL₃ with endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. *J Biol Chem*. 1984;259:13897-13905.
- ⁴¹ Rigotti A. Function and regulation of hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI). *International Congress Series*. 2004;1262:527-530. *Atherosclerosis XIII. Proceedings of the 13th International Atherosclerosis Symposium*. doi:10.1016/j.ics.2003.12.007.
- ⁴² Oram JF, Albers JJ, Cheung MC y Bierman EL. The effects of subfractions of high density lipoprotein on cholesterol efflux from cultured fibroblasts. Regulation of low density lipoprotein receptor activity. *J Biol Chem*. 1981;256:8348-8356.
- ⁴³ Rifichi VA y Eder HA. A hepatocyte receptor for high-density lipoproteins specific for apoprotein AI. *J Biol Chem*. 1984;259:13814-13818.
- ⁴⁴ Kannel WB, Thomas HE y Kjølberg BO. Overall and coronary heart disease normally rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MFRIT. *Am Heart J*. 1986;112:825-826.
- ⁴⁵ Castelli WP. Cardiovascular disease and multifactorial risk. Challenge of the 1980s. *Am Heart J*. 1983;106:1191-1200.
- ⁴⁶ The Pooling Project Research Group. Relationship blood pressure, serum cholesterol, smoking habit, relative weight and ECG abnormalities to evidence of major coronary events. Final report of the Pooling Project. *J Chron Dis*. 1978;31:201-306.
- ⁴⁷ Lipids Research Clinics Programme. The Lipids Research Clinics Coronary prevention trials results. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA*. 1984;251:358-364.
- ⁴⁸ Manninen V. Clinical results with gemfibrozil and background for the Helsinki Heart Study. *Am J Cardiol*. 1983;52:35-38.

-
- ⁴⁹ Barter PJ, Baker PW y Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipid*. 2002;13:285-288.
- ⁵⁰ Fielding CJ y Fielding PE. Molecular physiology of cholesterol reverse transport. *J Lipid Res*. 1995;36:211-228.
- ⁵¹ Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res*. 2000;41(8):1261-1267
- ⁵² Barter PJ, Brewer HB Jr, Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ y Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:160-167.
- ⁵³ Parthasarathy S, Barnett J y Fong LG. High-density lipoproteins inhibit the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1044:275-283.
- ⁵⁴ Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Chaddha M, Hough G y Fogelman AM. Oral administration of an Apo A-I mimetic peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation*. 2002;105:290-292.
- ⁵⁵ Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL y Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:6993-6997.
- ⁵⁶ Klimov AN, Kozhevnikova KA, Kuznetsov AS, Kuzmin AA y Belova EV. On the ability of high density lipoproteins to remove phospholipid peroxidation products from erythrocyte membranes. *Biochemistry*. 2001;66:300-304.
- ⁵⁷ Navab M, Berliner JA, Subbanagounder G y Hama SY. HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:481-488.
- ⁵⁸ Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ y col. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:831-842.
- ⁵⁹ Minna L, Hannuksela ME, Brousseau SM, Meyn HN, Giovanni Bader RD, Shamburek PA y Brewer HB Jr. In vivo metabolism of apolipoprotein E within the HDL subpopulations LpE, LpE:A-I, LpE:A-II and LpE:A-I:A-II. *Atherosclerosis*. 2002;165:205-220.

- ⁶⁰ Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC y Clavey V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;164:1-13.
- ⁶¹ Mesa MD, Aguilera CM, Ramírez-Tortosa CL, Gil A y Ramírez-Tortosa MC. Effect of olive oil on cardiovascular risk factor, LDL oxidation and atherosclerosis development. En: *Olive Oil and Health*. Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC y Yaqoob P. Eds. Cabi, Oxfordshire, UK, 2006; pp. 194-222.
- ⁶² Wilson D, Massaeli H, Pierce GN y Zahradka P. Nature and minimally oxidized low density lipoprotein depress smooth muscle matrix metalloproteinase levels. *Mol Cell Biochem*. 2003;249:141-149.
- ⁶³ Spiteller G. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars and proteins into deleterious products. *Free Rad Biol Med*. 2006;41:362-387.
- ⁶⁴ Sánchez-Muniz FJ, Varela P, Bastida S y González JM. Enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial y dislipemias. En: *Cuidados farmacológicos y nutricionales en el paciente en la edad avanzada*. Carvajal A y Varela P. Eds. Fundación General de la Universidad Complutense, 2001.
- ⁶⁵ Mody N, Parhami F, Sarafian TA y Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. *Free Rad Biol Microbiol*. 2001;31:509-519.
- ⁶⁶ Badimón L, Martínez-González J. Bases moleculares y genéticas de las cardiopatías. En *Cardiología clínica*. Bayés de Luna A, López Sendon JL, Attie F, Alegría Ezquerro E, Eds. Barcelona, Masson S.A, 2003;pp. 30-44.
- ⁶⁷ Cybulski MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251:788-791
- ⁶⁸ Badimón L y Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol*. 2006;6(Supl A):21-30
- ⁶⁹ Gerschman R, Gilbert D, Nye SW, Dwyer P y Fenn WO. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science*. 1954;119:623-626.
- ⁷⁰ Mataix Verdú J, Rodríguez J, Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M y López M. Aceite de oliva y estado oxidativo celular. En: *Aceite de Oliva Virgen: nuestro patrimonio alimentario*. Mataix Verdú J. Ed. Editorial Universidad de Granada y Puleva Food. 2001; vol. 2, pp. 37-78.

- ⁷¹ Diplock AT. Defense against reactive oxygen species. *Free Radic Res.* 1998;29:463-467.
- ⁷² Halliwell B, Gutteridge JM y Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119:598-620.
- ⁷³ Littarru GP. Facts and perspectives on coenzyme Q10 in biology and medicine. En *Energy and defense*. Ed CESI. Roma, Italia, 1994.
- ⁷⁴ Kukreja RC, kontos HA, Hess ML y Ellis FF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res.* 1986;59:612-619.
- ⁷⁵ Halliwell B y Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med.* 1985;8:189-193.
- ⁷⁶ Halliwell B y Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Third edition. New York, Oxford University Press, 1999.
- ⁷⁷ Lunec J. Free radicals: their involvement in disease processes. *Biochim Clin.* 1992;16:99-108.
- ⁷⁸ Cascales M. La toxicidad del oxígeno. Estrés oxidativo. En: *Estrés oxidativo. envejecimiento y enfermedad*. Instituto de España, Madrid, 1999; pp 9-46.
- ⁷⁹ Monaghan P, Metcalfe NB y Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett.* 2009, 12:75-92.
- ⁸⁰ Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994;74:139-162.
- ⁸¹ Stryer DB, Bero LA. Drug Promotion. *N Engl J Med.* 1995;332:1032.
- ⁸² Canales A, Sánchez-Muniz FJ. Paraoxonasa, ¿algo más que una enzima? *Med Clin (Barc)* (2003);121:537-548.
- ⁸³ Durrington PN, Mackness B y Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:473-480.
- ⁸⁴ Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS y La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoproteins against oxidation. *J Biol Chem.* 2000;275:33435-33442.
- ⁸⁵ Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson CH y La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Disp.* 2000;28:1335-1342.
- ⁸⁶ Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, et al. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 1998;9:319-24.

-
- ⁸⁷ Uriel A. Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique après électrophorèse et immunoelectrophorèse en gélose I: applications à l'étude des esterases de sérum humain normal. *Ann Inst Pasteur* 1961;101:104.
- ⁸⁸ Blatter MC, James RW, Messmer S, Barja F, Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-85: identity of K-85 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993;211:871-879.
- ⁸⁹ Protein Data Bank.
<http://www.rcsb.org/pdb/navbarsearch.do?newSearch=yes&isAuthorSearch=no&radioset=All&inputQuickSearch=1v04>.
- ⁹⁰ de Silva HV, Stuart WD, Duvic CR, Wetterau JR, Ray MJ, Ferguson DG, Albers HW, Smith WR y Harmony JAK. A 70-kDa apolipoprotein designated apo J is a marker for subclasses of human plasma high-density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1990;265:13240-13247.
- ⁹¹ Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC y Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.* 1994;33:832-839.
- ⁹² Mackness MI, Mackness B, Arrol S, Wood G, Turkie W y Durrington PN. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS J.* 1998;423:57-60.
- ⁹³ Mackness B, Durrington PN y Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmac.* 1998;31:329-336.
- ⁹⁴ Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman J y Tawfik DS. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:412-419.
- ⁹⁵ Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RBG, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman J y Tawfik DS. Corrigendum Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11:1253.
- ⁹⁶ Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS y La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol Med.* 1999;26:892-904.

-
- ⁹⁷ Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, Navab M, Shih D y Fonarow GC. Paraonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9:319-324.
- ⁹⁸ Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL y La Du BN. Paraonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions, a possible peroxidative role for paraonase. *J Clin Invest*. 1998;101:1581-1590.
- ⁹⁹ Shih DM, Xia YR, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Wilztum JL y Lusis AJ. Combined serum paraonase Knockout/apolipoprotein E knockout mice increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2000;275:17527-17535.
- ¹⁰⁰ Rozenberg O, Rosenblat M, Coelman R, Shih DM y Aviram M. Paraonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Rad Biol Med*. 2003;34:774-784.
- ¹⁰¹ Rozenberg O, Shih SD y Aviram M. Paraonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis*. 2005;101:1581-1590.
- ¹⁰² Mackness MI, Arrol S, Abbot CA y Durrington PN. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraonase. *Atherosclerosis*. 1993;104:129-135.
- ¹⁰³ Aviram M y Rosenblat M. Paraonases 1, 2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Rad Biol Med*. 2004;37:1304-1316.
- ¹⁰⁴ Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, Rosenblat M, Eroglu J, Dunlop C y La Du BN. Paraonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different than that required for its arylesterase/paraonase activities: selective action of human paraonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1617-1624.
- ¹⁰⁵ Yla-Hertuala S, Palinski W y Rosenfeld, M.E. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoproteins in atherogenic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*. 2000;84:1086-1095.

-
- ¹⁰⁶ Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M y Mackness M. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;318:680-683.
- ¹⁰⁷ Cockerill GW, Huckins TY, Weerasingh A, Stocker C, Lerch PG, Miller NE y Haskard DO. Elevation of plasma high-density lipoprotein reduces interleukin-1-induced expression of E-selection in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation.* 2001;103:108-112.
- ¹⁰⁸ Cockerill GW, McDonald MC, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S, Miller NE y Thiemmerman C. High density lipoproteins reduce organ injury and organ dysfunction in a rat model of hemorrhagic shock. *FASEB.* 2001;15:1941-1952.
- ¹⁰⁹ Fuhrman B, Volkova N y Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized LDL in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis.* 2002;161:307-316.
- ¹¹⁰ Rozenberg O, Shih DM y Aviram M. Human serum paraoxonase (PON1) decreases macrophage cholesterol biosynthesis: a possible role for its phospholipase-A2 activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:461-467.
- ¹¹¹ Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 1996;33:498-509.
- ¹¹² Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:542-547.
- ¹¹³ Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, Nickle DC, Majer M, Huizenga JJ, Tsui LC y Prochazka M. Human PON 2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene.* 1998;213:149-57.

-
- ¹¹⁴ Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J y Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics* 1996;14:334-336.
- ¹¹⁵ Azarsiz E, Kayikcioglu M, Payzin S y Yildirim Sozmen E. PON1 activities and oxidative markers of LDL in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2003;91:43-51.
- ¹¹⁶ McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S y Walter CH. Distribution of paraoxon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem.* 1986;32:671-673.
- ¹¹⁷ Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J y Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:330-335.
- ¹¹⁸ Mackness B, Durrington PN, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M y Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly prospective. *Circulation.* 2003;107:2775-2779.
- ¹¹⁹ Canales A, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Sánchez-Muniz FJ y Benedi J. Platelet aggregation, eicosanoid production and thrombogenic ratio in individuals at high cardiovascular risk consuming meat enriched in walnut paste. A crossover, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2009;102:134-141.
- ¹²⁰ Nus M, Sánchez-Muniz FJ y Sánchez-Montero JM. A new method for the determination of arylesterase activity in human serum using simulated body fluid. *Atherosclerosis.* 2006;188:155-159.
- ¹²¹ Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8:1227-1234.
- ¹²² Badimón L, Vilahur G y Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:1161-1178.
- ¹²³ Varga-Szabo D, Pleines I y Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28: 403-412.
- ¹²⁴ Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN y Scher CD. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood.* 1979;53:1043-1052.

- ¹²⁵ Moncada S. Adventures in vascular biology: A tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361:735-759.
- ¹²⁶ Davi G y Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 2007; 357:2482-2494.
- ¹²⁷ Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest* 2003;124:18S-25S.
- ¹²⁸ Jin RC, Voetsch B y Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation.* 2005;12:247-258.
- ¹²⁹ Nityanand S, Pande I, Bajpai VK, Singh L, Chandra M y Singh BN. Platelets in essential hypertension. *Thromb Res.* 1993;72:447-454.
- ¹³⁰ Broijerssen A, Karpe F, Hamsten A, Goodall AH y Hjemdahl P. Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet p-selectin without affecting other markers of platelet activation. *Atherosclerosis.* 1998;137:107-113.
- ¹³¹ Nowak J, Murray JJ, Oates JA y FitzGerald GA. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation.* 1987;76:6-14.
- ¹³² Manduteanu I, Calb M, Lupu C, Simionescu N y Simionescu M. Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1992;24:539-547.
- ¹³³ Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:18-22
- ¹³⁴ Stenberg P, McEver R, Shuman M, Jacques Y, Bainton DF. A platelet alpha granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol.* 1985;101:880-886.
- ¹³⁵ Brummel KE, Paradis SG, Butenas S y Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002; 100:148-152.
- ¹³⁶ Mann KG. Thrombin formation. *Chest* 2003; 124:4S-10S.
- ¹³⁷ Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99:1293-1304.
- ¹³⁸ Dorsam RT y Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004; 113:340-345.
- ¹³⁹ Derian CK, Damiano BP, Addo MF, Darrow AL, D'Andrea MR, Nedelman M, Zhang HC, Maryanoff BE y Andrade-Gordon P. Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus

formation and vascular occlusion in nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304:855-861.

¹⁴⁰ Kato Y, Kita Y, Hirasawa-Taniyama Y, Nishio M, Mihara K, Ito K, Yamanaka T, Seki J, Miyata S y Mutoh S. Inhibition of arterial thrombosis by a protease-activated receptor 1 antagonist, FR171113, in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 2003;473:163-169.

¹⁴¹ Vandendries ER, Hamilton JR, Coughlin SR, Furie B y Furie BC. Par4 is required for platelet thrombus propagation but not fibrin generation in a mouse model of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:288-292.

¹⁴² Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005;3:1800-1814.

¹⁴³ Angiolillo DJ, Ueno M y Goto S Basic principles of platelet biology and clinical implications. *Circ J*. 2010;25;74:597-607.

¹⁴⁴ Funk C. D. 2001. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001;294(5548):1871-1875.

¹⁴⁵ Schaloske R. H., and E. A. Dennis. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 2006;1761:1246-1259.

¹⁴⁶ Moes M, Boonstra J y Regan-Klapisz E. Novel role of cPLA₂ α in membrane and actin dynamics *Cell Mol Life Sci*. 2010;67:1547-1557.

¹⁴⁷ Riccioni G, Zanasi A, Vitulano N, Mancini B y D'Orazio N. Leukotrienes in atherosclerosis: New target insights and future therapy perspectives. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:737282.

¹⁴⁸ Maskrey BH, Bermúdez-Fajardo A, Morgan AH, Stewart-Jones E, Dioszeghy V, Taylor GW, Baker PR, Coles B, Coffey MJ, Kühn H y O'Donnell VB. Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. *J Biol Chem*. 2007;282:20151-20163.

¹⁴⁹ Thomas CP, Morgan LT, Maskrey BH, Murphy RC, Kühn H, Hazen SL, Goodall AH, Hamali HA, Collins PW y O'Donnell VB. Phospholipid-esterified eicosanoids are generated in agonist-activated human platelets and enhance tissue factor-dependent thrombin generation. *J Biol Chem*. 2010;285:6891-6903.

¹⁵⁰ Cho J y Mosher DF. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood*. 2006;107:3555-3563.

¹⁵¹ Gaetino. Piastrine, trombosi e aterosclerosis. Masson, Milan 1982 (citado por Oubiña, 1998).

- ¹⁵² Kawabe J, Ushikubi F y Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. *Circ J*. 2010;74:836-843.
- ¹⁵³ Skeaff CM, Hodson L y McKenzie JE. Dietary-induced changes in fatty acid composition of human plasma, platelet, and erythrocyte lipids follow a similar time course. *J Nutr*. 2006;136:565-569.
- ¹⁵⁴ Sánchez-Muniz FJ, Bastida S, Quintas E, Merinero MC y Rodríguez-Gil S. Heterogeneous responsiveness of normolipemic women to n-3 long chain fatty acid supplementation. Changes in serum lipids and apoproteins. *Rev Esp Fisiol*. 1997;53:349-354.
- ¹⁵⁵ Needleman SW, Spector AA y Hoak JC. Enrichment of human platelet phospholipids with linoleic acid diminishes thromboxane release. *Prostaglandins*. 1982;24:607-622.
- ¹⁵⁶ Oubiña P, Sánchez-Muniz FJ, Ródenas S y Cuesta C. Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *Br J Nutr*. 2001;85:41-47.
- ¹⁵⁷ Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S y Vane JR. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*. 1978;15;2(8081):117-119.
- ¹⁵⁸ Sørensen JD y Olsen SF. Effects of fish oil supplementation in late pregnancy on prostaglandin metabolism. *World Rev Nutr Diet*. 1994;76:122-125.
- ¹⁵⁹ Chiesa JAL, Petersen ACB. El ABC de las prostaglandinas. Editorial Toray, S.A. Barcelona, 1983
- ¹⁶⁰ Goodnight SH Jr, Harris WS, Connor WE y Illingworth DR. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis*. 1982;2:87-113.
- ¹⁶¹ Tandon N, Harmon JT, Rodbard D y Jamieson GA. Thrombin receptors define responsiveness of cholesterol-modified platelets. *J Biol Chem*. 1983;258:11840-11845.
- ¹⁶² Stuart MJ, Gerrard JM y White JG. The influence of albumin and calcium on human platelet arachidonic acid metabolism. *Blood*. 1980;55:418-423.
- ¹⁶³ Pintó X, Llargués E, Fiol C, Marcos C, Fernández-Nogués F y Pujol R. Factors associated with generalized forms of arteriosclerosis in patients with coronary disease *Rev Clin Esp*. 1990;187:334-338.

-
- ¹⁶⁴ Rolland PH, Jouve R, Pellegrin E, Mercier C y Serradimigni A. Alteration in prostacyclin and prostaglandin E2 production. Correlation with changes in human aortic atherosclerotic disease. *Arteriosclerosis*. 1984;4:70-78.
- ¹⁶⁵ Winocour PD, Kinlough-Rathbone RL, Morazain R y Mustard JF. Effect of the amount and type of dietary fat on platelet function, platelet survival and response to continuous aortic injury in rats. *Atherosclerosis*. 1987;68:221-230.
- ¹⁶⁶ Sugano M y Imaizumi K. Effect of palm oil on lipid and lipoprotein metabolism and eicosanoid production in rats. Effect of palm oil on lipid and lipoprotein metabolism and eicosanoid production in rats. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1034S-1038S.
- ¹⁶⁷ Sánchez-Muniz FJ, Oubiña P, Ródenas S, Benedi J y Cuesta C. Platelet aggregation, thromboxane production and thrombogenic ratio in postmenopausal women consuming high oleic acid-sunflower oil or palmolein. *Eur J Nutr*. 2003;42:299-306.
- ¹⁶⁸ Srivastava KC y Awasthi KK. In vitro effect of unsaturated fatty acids on the balance between thromboxane A2 and prostacyclin in the blood vascular system. *Prostaglandins Leukot Med*. 1983;12:449-459.
- ¹⁶⁹ Ballou LR y Cheung WY. Inhibition of human platelet phospholipase A2 activity by unsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(2):371-375.
- ¹⁷⁰ Boudreau MD, Chanmugam PS, Hart SB, Lee SH y Hwang DH. Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:111-117.
- ¹⁷¹ Batres-Cerezo R, Dupont J, Garcia PA, Kies C y Mathias MM. Studies of women eating diets with different fatty acid composition. III. Fatty acids and prostaglandin synthesis by platelets and cultured human endothelial cells. *Am Coll Nutr*. 1991;10:327-39.
- ¹⁷² Sarkkinen ES, Agren JJ, Ahola I, Ovaskainen ML y Uusitupa MI. Fatty acid composition of serum cholesterol esters, and erythrocyte and platelet membranes as indicators of long-term adherence to fat-modified diets. *Am J Clin Nutr*. 1994;59:364-370.
- ¹⁷³ Sarkkinen ES, Uusitupa MI, Pietinen P, Aro A, Ahola I, Penttilä I, Kervinen K y Kesäniemi YA. Long-term effects of three fat-modified diets in hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis*. 1994;105:9-23.

-
- ¹⁷⁴ Fitzgerald GA, Braden G, Fitzgerald DJ y Knapp HR. Fish oils in cardiovascular disease. *J Intern Med Suppl.* 1989;731:25-29.
- ¹⁷⁵ Knapp HR y FitzGerald GA. The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N Engl J Med.* 1989;320:1037-1043.
- ¹⁷⁶ Canales A, Bastida S, Librelotto J, Nus M, Sánchez-Muniz FJ y Benedi J. Platelet aggregation, eicosanoid production and thrombogenic ratio in individuals at high cardiovascular risk consuming meat enriched in walnut paste. A crossover, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2009;102:134-141.
- ¹⁷⁷ Jeng JH, Chen SY, Liao CH, Tung YY, Lin BR, Hahn LJ y Chang MC. Modulation of platelet aggregation by areca nut and betel leaf ingredients: roles of reactive oxygen species and cyclooxygenase. *Free Radic Biol Med.* 2002;1;32:860-71
- ¹⁷⁸ Packham MA. Role of platelets in thrombosis and hemostasis *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72(3):278-284.
- ¹⁷⁹ Jawień J. The putative role of leukotrienes in experimental atherogenesis. *Pol Arch Med Wewn.* 2009;119:90-93.
- ¹⁸⁰ Peters-Golden M y Henderson WR. Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 2007;357:1841–1854.
- ¹⁸¹ Capra V, Thompson MD, Sala A, Cole DE, Folco G, y Rovati GE. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: critical update and emerging trends. *Med Res Rev.* 2007;27:469–527.
- ¹⁸² Tagerand AM y Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:123-134.
- ¹⁸³ Harmar AJ, Hills RA, Rosser EM, Jones M, Buneman OP, Dunbar DR, Greenhill SD, Hale VA, Sharman JL, Bonner TI, Catterall WA, Davenport AP, Delagrang P, Dollery CT, Foord SM, Gutman GA, Laudet V, Neubig RR, Ohlstein EH, Olsen RW, Peters J, Pin JP, Ruffolo RR, Searls DB, Wright MW y Spedding M. IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D680-685.
- ¹⁸⁴ Varani J y Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock* 1994;2:311–319.

-
- ¹⁸⁵ Hersberger M. Review: Potential role of the lipoxygenase derived lipid mediators in atherosclerosis: leukotrienes, lipoxins and resolvins. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48:1063-1073.
- ¹⁸⁶ Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y y Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature.* 1997;387(6633):620-624.
- ¹⁸⁷ Yokomizo T, Kato K, Terawaki K, Izumi T y Shimizu T. A second leukotriene B4 receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med.* 2000;192:421-432.
- ¹⁸⁸ Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T, Shimizu T. Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J Biol Chem.* 2001;276:12454-12459.
- ¹⁸⁹ Nassar GM, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Lakkis FG y Badr F. Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *J Biol Chem* 1994;269:27631–27634.
- ¹⁹⁰ Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J y Serhan CN. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(s)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest* 1993;92:1572–1579.
- ¹⁹¹ Serhan CN, Hamberg M y Samuelsson B. Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:943–949.
- ¹⁹² Claria J y Serhan CN. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9475-9479.
- ¹⁹³ Herb F, Thye T, Niemann S, Browne EN, Chinbuah MA, Gyapong J, Osei I, Owusu-Dabo E, Werz O, Rüsch-Gerdes S, Horstmann RD y Meyer CG. ALOX5 variants associated with susceptibility to human pulmonary tuberculosis. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1052-1060.
- ¹⁹⁴ Sánchez-Muniz FJ y Bastida S. Ácidos grasos omega-3 y protección cardiovascular. Consideraciones sobre su consumo y recomendaciones para la población española. *Rev Nutr Practica* 1997;1:123-138.

- ¹⁹⁵ Código Alimentario Español. Agencia Española de Seguridad Alimentaria. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 2003
- ¹⁹⁶ Feldman EB. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease. *J Nutr.* 2002;132:1062S-1101S.
- ¹⁹⁷ Rabia, M. California walnuts: the natural way to a healthier Herat. *Nutr. Today* 1995;30:173-176.
- ¹⁹⁸ Nus M, Ruperto M y Sánchez-Muniz FJ. Frutos secos y riesgo cardío y cerebrovascular. Una perspectiva española. *Archiv Latinoam Nutr.* 2004;54:137-148.
- ¹⁹⁹ Sánchez-Muniz FJ y Bastida S. Biodisponibilidad de ácidos grasos. *Revista de Nutrición Práctica* 2000;4:48-64.
- ²⁰⁰ Vázquez J y Sánchez-Muniz FJ. Revisión: Proteína de pescado y metabolismo del colesterol. *Rev Esp Cien Tecnol Alim* 1994;34:589-608.
- ²⁰¹ Cooke JP y Singer TP. Anti-atherogenic effect of nuts. Is the answer NO? *Arch Intern Med* 1993;153:898-899.
- ²⁰² Badimón L, Vilabur G y Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis *Rev Esp Cardiol* 2009;62:1161-1178.
- ²⁰³ Guías Alimentarias para la Población Española. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. IM&C, S.A.2001.
- ²⁰⁴ Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y y Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary disease in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1996;334:1156-1162.
- ²⁰⁵ Pons A, y Tur JA. Consumo e impacto nutricional de los frutos secos. Comité Científico Fundación Ucí.
- ²⁰⁶ KrisEtherton, PM, PhD, RD, Hecker KD, MS, RD, Bonamone A, MD y Coval SM. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American J Med.* 2002;113(9B):71S-88S.
- ²⁰⁷ Buchbauer G y Jirovetz L. Volatile constituents of the essential oil of the peles of *Juglans nigra* L. *J Essent Oil Res.* 1992;4:539-541.
- ²⁰⁸ Lavedrine F, Ravel A, Poupard A y Alary J. Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chem.* 1996;58:135-140.

-
- ²⁰⁹ Sabaté J, Fraser GE, Burke K, Knustsen, SF, Bennett H y Lindsted KD. Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men *N Engl J Med*. 1993;328:603-607.
- ²¹⁰ Abbey M, Noakes M, Belling GB y Nestel PJ. Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol. *Am. J Clin Nutr*. 1994;59:995-999.
- ²¹¹ Chisholm A, Mann J, Skeaff M, Frampton C, Sutherland W, Duncan A y Tiszacari S. A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects. *Eur J Clin Nutr*. 1998;52:12-16.
- ²¹² Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, Laguna JC y Ros E. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women: a randomized crossover trial. *Ann. Intern Med*. 2000;132:538-546.
- ²¹³ Almaro RU, Vonghavaravat V, Wong R y Kasim-Karakas SE. Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:72-79.
- ²¹⁴ Salas-Salvadó J, Fernández-Ballart J, Ros E, Martínez-González MA, Fitó M, Estruch R, Corella D, Fiol M, Gómez-García E, Arós F, Flores G, Lapetra J, Lamuela-Raventós R, Ruiz-Gutierrez V, Bulló M, Basore J y Govas MI; Investigadores Estudio Predimed. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med*. 2008;168:2449-2458.
- ²¹⁵ FDA2009. Food and Drug Administration. Office of Nutritional Products, Labelling and Dietary Supplements Qualified Health Claims Subject to Enforcement Discretion. Walnuts and heart disease.
<http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/LabelClaims/QualifiedHealthClaims/ucm073992.htm> Accessed 06/18/2009
- ²¹⁶ Bruinsma J (ed.) World agriculture: towards 2015/2030. An FAO perspective. Food and Agriculture of the United Nations. Londres.2003. (leído21-octubre-2003).
<http://www.fao.org/spanish /newsroom/news/2002/8280-es.html>.
- ²¹⁷ Dorado M, Martín-Gómez, EM, Jiménez-Colmenero F y Masoud TA. Cholesterol and fat contents of Spanish comercial pork cuts. *Meat Sci*. 1999;51:321-323.

-
- ²¹⁸ Chizzolini R, Zanardi E, Dorigoni V, Ghidini S 1999 Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meta and meta products. *Trends Food Sci Technol.* 10:119-128.
- ²¹⁹ Higgs JD. The changing nature of red meta: 20 years of improving nutrional quality. *Trends Food Sci Technol.* 2000;11:85-95.
- ²²⁰ Grundy SM. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr.* 1994;60(6 Suppl):986S-990S.
- ²²¹ Belury M. Not all trans fatty acids are alike: what consumers may lose when we oversimplify nutrition facts *J Am Diet Assoc.* 2002;102:1606-1607.
- ²²² Eynard AR y López CB. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer *Lipids Health Dis.* 2003;2:6-10.
- ²²³ Cruz S, de Juan-García ,P y Sánchez-Muniz FJ. CLA ¿antioxidante o prooxidante? *Grasas y aceites* 2000;51:268-274.
- ²²⁴ Terpstra AH. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:352-361.
- ²²⁵ Gibson S y Ashwell M. The association between red and processed meat consumption and iron intakes and status among British adults. *Public Health Nutr.* 2003;6:341-350.
- ²²⁶ Toxqui L, Piero AD, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ y Vaquero MP. Iron deficiency and overload: Implications in oxidative stress and cardiovascular health. *Nutr Hosp.* 2010;25:350-365.
- ²²⁷ Ovesen L, Brot C y Jakobsen J. Food contents and biological activity of 25-hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with? *Ann Nutr Metab.* 2003;47:107-113.
- ²²⁸ Aranceta J. ¿Es necesario incluir alimentos funcionales en nuestra alimentación? *Revista de Nutrición Práctica* 2002;6:47-50.
- ²²⁹ Sánchez-Muniz F.J. Alimentos funcionales: carne y derivados cárnicos, presente y perspectivas. En Jimenez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla Alonso B, editores. *La Carne y productos cárnicos como alimentos funcionales.* Madrid: Editorial Editec; 2004.p.39-59.

-
- ²³⁰ Ashwell M. 2002 Conceptos sobre los alimentos funcionales. En: ILSI EU-ROPE Concise Monograph Series (Versión Española, 2004), Bélgica: International Life Sciences Institute. <http://europe.ilsa.org>
- ²³¹ Salmeron, citado por Sánchez-Muniz FJ. Curso de Doctorado. Alimentación funcional y nutrigenómica. Facultad de Farmacia. 2009.
- ²³² Diplock AT, Agget PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB y Roberfroid MB. PASSCLAIM Scientific concepts of functional food in Europe: Consensus Document. *Br J Nutr* 1999;81:S1-S17.
- ²³³ Aggett PJ, Antoine JM, Asp NG, Bellisle F, Contor L, Cummings JH, Howlett J, Müller DJ, Persin C, Pijls LT, Rechkemmer G, Tuijelaars S y Verhagen H. PASSCLAIM: consensus on criteria. *Eur J Nutr*. 2005;44 Suppl 1:i5-30.
- ²³⁴ Contor L y Asp NG. Process for the assessment of scientific support for claims on foods (PASSCLAIM) phase two: moving forward. *Eur J Nutr*. 2004;43 Suppl 2:II3-II6.
- ²³⁵ Asp NG y Bryngelsson S. Health claims in Europe: new legislation and PASSCLAIM for substantiation. *J Nutr*. 2008;138:1210S-1215S.
- ²³⁶ Bastida S y Sánchez-Muniz FJ. Nutrición y obesidad. *Rev Nutr Práctica* 1999;3:49-58.
- ²³⁷ Palou A, Serra F y Pico C. General aspects of the assessment of functional foods in the European Union *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(suppl.1):S12-S17.
- ²³⁸ Diehl JF. 2002 The stage is set for nutrition message in Europe. International Tree Nut Council. INC. Available from http://inc.treenuts.org/art_apr01_2.html. Accessed 15/01/2002
- ²³⁹ Kim JS, Godber JS y Prinaywiwatkul W. Restructured beef roasts containing rice bran oil and fiber influences cholesterol oxidation and nutritional profile *Journal of Muscle Foods* 2002;11:111-127.
- ²⁴⁰ Jiménez-Colmenero F, Carballo J y Cofrades. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat science* 2001;59:5-13.
- ²⁴¹ Boles JA, y Shand PJ. Effects of raw binder system, meat cut and prior freezing on restructured beef. *Meat Science* 1999;53:233-239.
- ²⁴² Farouk MM, Hall WK y Swan JE. Attributes of beef sausages, batters, patties and restructured roasts from two boning systems. *J Muscle Foods*. 2000;11:197-212.

- ²⁴³ Schmidt GR, Hollingswoorth CA y Sleeth RB. Future of restructured meat and poultry products. En *Advance in meat research*; AM Pearson y RT Dutson Eds. Van Nostrand, New York, 1987 (Vol. 3) pp. 489–496.
- ²⁴⁴ Raharjo S, Dexter DR., Worfel RC, Sofos JN, Solomon MB Shults GW y Schmidt GR. Quality characteristics of restructured beef steaks manufactured by various techniques. *J Food Sci.* 1995;60:68–71.
- ²⁴⁵ Hollan S. Free radicals in health and disease. *Haematologia Budap.* 1995;26:177-189.
- ²⁴⁶ FDA (2004). Moves Forward on Qualified Healht Claims. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2004/ucm108273.htm>. Accessed 06/18/2009
- ²⁴⁷ Serrano A, Cofrades S, Ruiz-Capillas C, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C y Jiménez-Colmenero F. Nutritional profile of restructured beef steak with added walnuts. *Meat Sci.* 2005;70:647-654.
- ²⁴⁸ FDA (2003). Food and Drug Administration. Office of Nutritional Products, Labelling and Dietary Supplements. Qualified Health Claims: Walnuts and Coronary Heart (Docket No 02P-0292). <http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/LabelClaims/QualifiedHealthClaims/uc072910.htm>. Accessed 06/22/2009.
- ²⁴⁹ Keys A, Anderson JT y Grande F. Serum cholesterol response to changes in die IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 1965;14:776-787.
- ²⁵⁰ Paulus JM y Aster RH. Production distribution, life-span and fate of platelets. In *Hematology*, 1985, 3rd ed.; 1185 [WJ Williams, E. Beutler, AJ Erslev y MA Lichtman, editors]. New York: McGraw Hill.
- ²⁵¹. Moreiras O, Carbajal A Cabrera L y Cuadrado C. Tablas de composición de Alimentos. Eds. Editorial Pirámide, Madrid, 2007.
- ²⁵² Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I y Sánchez-Muniz FJ. Productos cárnicos funcionales preparados con nuez. Evaluación del efecto funcional. *Alimentación* 2005;24:37-41.
- ²⁵³ www.who.int
- ²⁵⁴ Fairbanks VF y Klee GG: Biochemical aspects of hematology. En *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 3rd. Burtis CA, Ashwood ER Eds. WB Saunders, Philadelphia, 1998; pp 1642–1710.

-
- ²⁵⁵ Barham D y Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*. 1972;97:142-145.
- ²⁵⁶ Fossati P, Prencipe L y Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine *Clin Chem*. 1980;26:227-231.
- ²⁵⁷ Tomás M, Sentí M, García-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M y Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2113-2119.
- ²⁵⁸ Motti C, Dessi M, Gnasso A, Irace C, Indigeno P, Angelucci CB, Bernardini S, Fucci G, Federici G y Cortese C. A multiplex PCR-based DNA assay for the detection of paraoxonase gene cluster polymorphisms. *Atherosclerosis*. 2001;158:35-40.
- ²⁵⁹ Hixson J y Powers PK. Restriction isotyping of human apolipoprotein A-IV: rapid typing of known isoforms and detection of a new isoform that deletes a conserved repeat. *J Lipid Res*. 1991;32:1529-1535.
- ²⁶⁰ Esterbauer H, Schaur RJ y Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes *Free Radic Biol Med*. 1991;11:81-128.
- ²⁶¹ Cardinal DC y Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980;3:135–158.
- ²⁶² Hishinuma T, Yu GS, Takabatake M, Nakagawa Y, Ito K, Nishikawa M, Ishibashi M, Suzuki K, Matsumoto M, Toyoda T y Mizugaki M. Analysis of the thromboxane/prostacyclin balance in human urine by gas chromatography/selected ion monitoring: abnormalities in diabetics. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;54, 445–449.
- ²⁶³ Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem*. 1976;72:248-254.
- ²⁶⁴ Luck H. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. (1965) *Methods in Enzymatic Analysis*. Academic Press, NY. pp 885-894.
- ²⁶⁵ Marklund S y Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974;47:469-474.

- ²⁶⁶ Hissin PJ y Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214-226.
- ²⁶⁷ Garcia-Lorda P, Megias-Rangil I y Salas-Salvadó J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:8-11.
- ²⁶⁸ MacDonald L, Foster BC y Akhtar H. Food and therapeutic product interactions - a therapeutic perspective. *J Pharm Pharm Sci.* 2009;12(3):367-377.
- ²⁶⁹ Jimenez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ y Olmedilla-Alonso B. Eds. La Carne y productos cárnicos como alimentos funcionales. FEN Editec Madrid 2004; pp 91-107.
- ²⁷⁰ <http://www.fao.org/Ag/againfo/themes/en/meat/background.html>. Entrada el 16 de junio de 2010.
- ²⁷¹ Dorado M, Martín-Gómez, EM, Jiménez-Colmenero F y Masoud TA. Cholesterol and fat contents of Spanish commercial pork cuts. *Meat Sci.* 1999;51:321-323.
- ²⁷² Chizzolini R, Zanardi E, Dorigoni V y Ghidini S. Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meta and meta products *Trends Food Sci Technol* 1999;10:119-128.
- ²⁷³ Carbajal Azcona A. Consumo de carne y tendencias: calidad de vida y epidemiología de enfermedades asociadas. En. La Carne y productos cárnicos como alimentos funcionales (Jimenez-Colmenero F, Sánchez-Muniz FJ, Olmedilla-Alonso B Eds). FEN Editec, Madrid, 2004; pp 15-38,
- ²⁷⁴ Bonamone AMD y Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels *N Engl J Med* 1988;318:1244-1248.
- ²⁷⁵ Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Herrero-Barbudo, C y Blanco-Navarro I. Nutritional approach for designing meat-based functional food products with nuts. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46:537-542.
- ²⁷⁶ Serrano A, Cofrades S, y Jiménez-Colmenero F. Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat Sci.* 2006;72:108–115.
- ²⁷⁷ Serrano A, Librelotto J, Cofrades S, Sánchez-Muniz FJ y Jiménez Colmenero F. Composition and physicochemical characteristics of restructured beef steaks containing walnuts as affected by cooking method. *Meat Sci.* 2007;77:304-313.
- ²⁷⁸ Kuo CL y La Du BN. Comparison of purified human and rabbit serum paraoxonases. *Drug Metab Dispos.* 1995;215:127-138.

-
- ²⁷⁹ Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S y La Du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic n-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2214-2225.
- ²⁸⁰ Nus M, Frances F, Librelotto J, Canales A, Corella D, Sanchez-Montero JM y Sanchez-Muniz FJ. Arylesterase activity and antioxidant status depend on PON1-Q192R and PON1-L55M polymorphisms in subjects with increased risk of cardiovascular disease consuming walnut-enriched meat. *J Nutr.* 2007;137:1783-1788.
- ²⁸¹ Nus M, Sánchez-Muniz FJ y Sánchez-Montero JM. Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I. *An R Acad Nac Farm.* 2008;74: 5-27.
- ²⁸² Weinbrenner T, Cladellas M, Covas MI, Fito M, Tomas M, Senti M, Bruguera J y Marrugat J. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 2003;168:99-106.
- ²⁸³ Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H y Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modifications of LDL. *Free Radical Biol Med* 1992;13:341-390.
- ²⁸⁴ Arbonés G, Carbajal A, Gonzalvo B, González-Gross M, Joyanes M, Marques-Lopes I, Martín ML, Martínez A, Montero P, Núñez C, Puigdueta I, Quer J, Rivero M, Roset MA, Sánchez-Muniz FJ y Vaquero MP. Nutrition and dietary recommendations for the elderly "Public Health" Working Group of the Spanish Nutrition Society. *Nutr Hosp.* 2003;18:109-137.
- ²⁸⁵ Bastida S. y Sánchez-Muniz FJ. "Nutrición y obesidad" *Revista de Nutrición Práctica* 3:49-58 (1999).
- ²⁸⁶ Li D, Saldeen T, Romero F y Mentha JL. Relative effects of alpha and gamma-tocopherol and low-density lipoprotein oxidation and superoxide dismutase and nitric oxide synthase activity and protein expression in rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1999;4:219-226.
- ²⁸⁷ Fukuda T, Ito H y Yoshida T. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L). *Phytochemistry.* 2003;63:795-801.
- ²⁸⁸ Okura T, Higaki J, Kurata M, Irita J, Miyoshi K, Yamazaki T, Hayashi D, Kohro T y Nagai R. Elevated serum uric acid is an independent predictor for cardiovascular events

in patients with severe coronary artery stenosis: subanalysis of the Japanese Coronary Artery Disease (JCAD) Study. *Circ J*. 2009;73:885-891.

²⁸⁹ Coutinho Tde A, Turner ST, Peyser PA, Bielak LF, Sheedy PF 2nd y Kullo IJ. Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome and subclinical coronary atherosclerosis. *Am J Hypertens*. 2007;20:83-89.

²⁹⁰ Kang DH. Potential role of uric Acid as a risk factor for cardiovascular disease Korean J Intern Med. 2010;25:18-20.

²⁹¹ Levine AS y Silvis SE. Absorption of whole peanuts, peanut oil, and peanut butter. *N Engl J Med*. 1980;16:303:917-918.

²⁹² Fraser GE, Bennett HW, Jaceldo KB y Sabate J. Effect on body weight of a free 76 kilojoule (320 calorie) daily supplement of almonds for six months. *J Am Coll Nutr* 2002;21:275-283.

²⁹³ Marlett JA, McBurney MI y Slavin JL. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc*. 2002;102:993-1000.

²⁹⁴ Jones PJ, Ridgen JE, Phang PT y Birmingham CL. Influence of dietary fat polyunsaturated to saturated ratio on energy substrate utilization in obesity. *Metabolism*. 1992;41:396-401.

²⁹⁵ Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y y Suzuki M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr*. 1995;125:920-925.

²⁹⁶ Akçay YD, Sagin FG, Sendağ F, Oztekin K y Sozmen EY. Effects of estrogen-only therapy on LDL oxidation in women with hysterectomy: does paraoxonase genotype play a role? *Maturitas*. 2006;53:325-332.

²⁹⁷ Sözmen EY, Sözmen B, Girgin FK, Delen Y, Azarsiz E, Erdener D y Ersöz B. Antioxidant enzymes and paraoxonase show a co-activity in preserving low-density lipoprotein from oxidation. *Clin Exp Med*. 2001;1:195-199.

²⁹⁸ Saldeen T, Li D y Mehta JL. Differential effects of alpha- and gammatocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1208–15. (Published erratum appears in *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:263.

²⁹⁹ Relou IA, Hackeng CM, Akkerman JW y Malle E. Low-density lipoprotein and its effect on human blood platelets. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:961-971.

-
- ³⁰⁰ Engelmann B, Kogl C, Kulschar R y Schaipp B. Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. *Biochem J*. 1996;315:781-789.
- ³⁰¹ Maschberger P, Bauer M, Baumann-Siemons J, Zangl KJ, Negrescu EV, Reininger AJ y Siess W. Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor src family and syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem*. 2000;275:19159-19166.
- ³⁰² Chan JK, McDonald BE, Gerrard JM, Bruce VM, Weaver BJ y Holub BJ. Effect of dietary alpha-linolenic acid and its ratio to linoleic acid on platelet and plasma fatty acids and thrombogenesis. *Lipids*. 1993;28:811-817.
- ³⁰³ Bai HW y Zhu BT. Strong activation of cyclooxygenase I and II catalytic activity by dietary bioflavonoids. *J Lipid Res*. 2008;49:2557-2570.
- ³⁰⁴ Ryo Fukasawa, Ayato Kanda y Setsuko Hara. Anti-oxidative Effects of Rooibos Tea Extract on Autoxidation and Thermal Oxidation of Lipids. *J Oleo Sci*. 2009;58:275-283.
- ³⁰⁵ Rubio-Guerra AF, Vargas-Robles H, Serrano AM, Vargas-Ayala G, Rodriguez-Lopez L y Escalante-Acosta BA. Correlation between the levels of circulating adhesion molecules and atherosclerosis in hypertensive type-2 diabetic patients *Clin Exp Hypertens*. 2010;32:308-310.
- ³⁰⁶ Calabresi L, Gomaraschi M, Villa B, Omoboni L, Dmitrieff C y Franceschini G. Elevated soluble cellular adhesion molecules in subjects with low HDL-cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:656-661.
- ³⁰⁷ Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharret AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr y Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96:4219-4225.
- ³⁰⁸ Ridcker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ y Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351:88-92.
- ³⁰⁹ Blake GJ y Ridker PM. Inflammatory biomarkers and cardiovascular risk prediction . *J Intern Med*. 2002;252:283-294.
- ³¹⁰ De Caterina R y Zampolli A. n-3 fatty acids:antiatherosclerotic effects. *Lipids*. 2001;(Suppl) 36:S69-S78.

- ³¹¹ De Caterina R y Libby P. Control of endothelial-leukocyte adhesión molecules by n-3 fatty acids. *Lipids*. 1996;31:557-563
- ³¹²³¹² De Caterina, R, Spiecker M, Solaini G, Basta G, Bosetti F, Libby P y Liao J. The inhibition of endothelial activation by unsaturated fatty acids. *Lipids*. 1999;34 (suppl) 36:S191-S194.
- ³¹³ Rallidis LS, Paschos G, Papaioannou ML, Liakos GK, Panagiotakos DB, Anastasiadis G y Zampelas A. The effect of diet enriched with α -linolenic acid on soluble adhesion molecules in dyslipidaemic patients *Atherosclerosis*. 2004;174:127-132.
- ³¹⁴ National Cholesterol Education Programme. National Institutes of Health. National Heart, Lung and Blood Institute: ATP Guidelines at a glance: Quick desk reference. Version current May 2001. Internet: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol> (accessed 28 October 2005).